

**SVEUČILIŠTE J.J. STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Srđan Glodić, apsolvant

Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

**UTJECAJ SUMPOROVODIKA (H<sub>2</sub>S) NA VIGOR SJEMENA KRASTAVCA  
(*Cucumis sativus* L.) U UVJETIMA SOLNOG STRESA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2014.**

SVEUČILIŠTE J.J. STROSSMAYERA U OSIJEKU

**POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Srđan Glodić, apsolvent

Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

**UTJECAJ SUMPOROVODIKA (H<sub>2</sub>S) NA VIGOR SJEMENA KRASTAVCA  
(*Cucumis sativus* L.) U UVJETIMA SOLNOG STRESA**

**Diplomski rad**

Povjerenstvo za obranu diplomskog rada:

1. Prof.dr.sc. Tihana Teklić, predsjednik
2. Doc.dr.sc. Miroslav Lisjak, mentor
3. Prof.dr.sc. Nada Parađiković, član

**Osijek, 2014.**

## SADRŽAJ

1.	UVOD .....	2
1.1.	Podrijetlo i sistematika krastavaca ( <i>Cucumis sativus</i> L.) .....	2
1.2.	Morfološka i biološka svojstva .....	2
1.3.	Hranidbena i zdravstvena vrijednost .....	4
1.4.	Proizvodnja-Hrvatska i svijet .....	5
1.5.	Uvjeti uzgoja .....	7
1.6.	Načini proizvodnje.....	7
1.6.1.	Uzgoj na otvorenom.....	8
1.6.2.	Uzgoj u zaštićenim prostorima.....	9
1.7.	Sumpor .....	11
1.7.1.	Sumpor u tlu.....	11
1.7.2.	Sumpor u biljkama.....	13
1.8.	Cilj istraživanja.....	14
2.	PREGLED LITERATURE.....	15
3.	MATERIJALI I METODE.....	21
3.1.	Postavljanje pokusa i korištena oprema.....	21
3.2.	Određivanje energije klijanja i standardne klijavosti.....	22
3.3.	Određivanje mase hipokotila, korijena i kotiledona.....	22
3.4.	Obrada podataka.....	22
4.	REZULTATI.....	23
5.	RASPRAVA .....	30
6.	ZAKLJUČAK .....	38
7.	POPIS LITERATURE .....	39
8.	SAŽETAK.....	44
9.	SUMMARY.....	45
10.	POPIS TABLICA.....	46
11.	POPIS SLIKA .....	47
12.	POPIS GRAFIKONA .....	48
	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	49
	BASIC DOCUMENTATION CARD.....	50

## 1. UVOD

### 1.1. Podrijetlo i sistematika krastavaca (*Cucumis sativus* L.)

Krastavac (*Cucumis sativus* L.) je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice tikvenjača *Cucurbitaceae* (Tablica 1). Prema nekim autorima vrsta *Cucumis sativus* potječe iz Afrike dok s druge strane, prema poznatom švicarskom botaničaru A. de Candollu današnji krastavac potječe iz Indije gdje se razvio pod utjecajem čovjeka od sitnih gorkih plodova *Cucumis hardwickii* sa južnih obronaka Himalaja (Lešić i sur., 2002.).

Sjemenke krastavaca nađene su u egipatskim grobnicama što upućuje na to da se krastavac kao cijenjena biljna vrsta gajio 2000. god. prije Krista. Iz drevnog Egipta sjemenke su prenešene trgovačkim karavanama u Grčku te nešto kasnije i po cijelom Rimskom carstvu. U srednjem vijeku, u cijeloj Europi i sjevernoj Americi uzgaja se i konzumira krastavac. Prvi intenzivan uzgoj krastavaca u staklenicima počeo je u Engleskoj u 19. stoljeću.

**Tablica 1.** Sistematika krastavaca (*Cucumis sativus* L.)

<i>Sistematika</i>	
Carstvo	<i>Plantae</i>
Podcarstvo	<i>Magnoliophyta</i>
Razred	<i>Rosopsida</i>
Red	<i>Cucurbitales</i>
Porodica	<i>Cucurbitaceae</i>
Rod	<i>Cucumis</i>
Vrsta	<i>Cucumis Sativus</i>

### 1.2. Morfološka i biološka svojstva

Krastavac je jednogodišnja biljka. Korijen je slabo razvijen i većim dijelom površinski raširen te je slabe usisne moći. Prodire u dubinu do 20-tak cm i u usporedbi s nadzemnim djelom znatno je manji i sporije raste. Odnos veličine korijena i stabljike u punoj rodnosti u uvjetima vanjskog uzgoja iznosi 1:10 do 1:20, a u hidroponskom načinu uzgoja taj odnos veličina doseže omjer 1:100 u korist stabljike (Lešić i sur., 2002.).

Stabljika krastavaca-vriježa, prekrivena je čekinjastim dlačicama, puzava je i razgranata. Dužina same stabljike ovisi o uvjetima uzgoja kao i o karakteristikama pojedinih sorti

a može narasti do 10 m. Po tlu se širi horizontalno ili se može penjati vertikalno uz potporanj pomoću vitica. Ovisno o tipu uzgoja, Matotan (1998.) pravi podjelu stabljike na:

1. nezavršeni tip rasta-raste tijekom cijele vegetacije,
2. završeni tip rasta-rast završava pojavom cvjetova na vrhu stabljike, te
3. zbijeni tip rasta gdje su vriježe vrlo kratke.

List je jednostavan, krupan, srcolikog oblika sa izraženim žilama na plojci i dugim peteljkaama naizmjenično postavljen na stabljiku (*Slika 1*).



**Slika 1.** Krastavac - *Cucumis sativus* L.

Izvor: <http://de.wikipedia.org/>

Krastavac je većinom jednodomna biljka koja na sebi nosi i muške i ženske cvjetove koji su jednospolni. Muški cvjetovi procvjetaju prije ženskih te su skupljeni u grozdastu cvat s više cvjetova. Nalaze se na kraćim peteljkaama na glavnoj stabljici i brojniji su od ženskih koji se formiraju češće na bočnim granama (Lešić i sur., 2002.).

Paradićović (2009.) napominje da se za intenzivan uzgoj koriste tri tipa kultivara pretežno sa ženskim cvjetovima:

- Jednodomni (monoecijski), odnos muških i ženskih cvjetova 10-20:1
- Pretežno ženski, u početku plodonošenja imaju par muških cvjetova
- Čisto ženski (ginecijski), samo ženski cvjetovi

Plod (peponis) je valjkastog oblika, različite dužine (5-70 cm), tamno-zelene do svjetlo-zelene boje. Na kori ploda mogu biti izražene i bradavičaste izrasline ali postoje i kultivari sa sasvim glatkom korom. Kako krastavac sazrijeva tako mu se i boja mijenja te je na kraju fiziološke

zriobe boja žuta ili čak smeđa a okus gorak, nejestiv. Sjemenke u plodu su brojne, spljoštene, bjelkaste boje, težine 28-35 g. Odlikuju se vrlo dobrom klijavošću koja je visokog postotka i nakon 6-7 godina (Lešić i sur., 2002.).

Matotan (1998.) s obzirom na vanjski izgled plodova hibride krastavaca dijeli na one:

- Američkog tipa (bradavičasti plodovi)
- Nizozemskog tipa (plodovi glatke kore)

### 1.3. Hranidbena i zdravstvena vrijednost

Blag i osvježavajući okus te prijatan miris uz nisku kaloričnost čine krastavce idealnom ljetnom salatom te se oni najčešće konzumiraju svježi kao salata ili konzervirani kiseli.

Često plodovi krastavaca imaju gorak okus koji potječe od alkaloida kukurbitacina. Gorčina je karakteristična samo za neke sorte i to se svojstvo javlja samo u nepovoljnim uvjetima uzgoja pri visokoj temperaturi, niskoj relativnoj vlažnosti zraka kao i pri zalijevanju hladnom vodom u najtoplijem dijelu dana što svakako prouzrokuje stres kod biljke (Lešić i sur., 2002.).

Veliki udjel vode čini krastavac odličnim diuretikom koji pomaže pri uklanjanju nakupljenih toksina iz organizma kao i boljem radu bubrega i žuči. Sirovi krastavac regulira rad crijeva, a stolicu čini mekšom. Sudjeluje u zaštiti svih stanica našeg organizma od malignih bolesti te dokazano snižava šećer u krvi te se preporučuje dijabetičarima (<http://www.doktor.rs/>).

**Tablica 2.** Kemijski sastav hranjivih tvari u 100 g krastavaca (Lešić i sur., 2002.).

voda	94,3-98,2%
sirove bjelančevine	0,3-1,96%
sirove masti	0,05-0,3%
ugljikohidrati	1,0-2,5%
šećeri	1,1-2,0%
vlakna	0,3-1,24%
minerali	0,04-0,89 %

Cijenjen je kod osoba sklonih debljanju jer su krastavci povrće s najmanjim postotkom kalorija (Tablica 2). U 100 g svježih krastavaca ima samo 8-10 kcal odnosno 3 do 42 kJ.

Od minerala je najzastupljeniji kalij, koji zajedno s natrijem pomaže u regulaciji i smanjenju visokog krvnog tlaka (*Tablica 3*). Treba napomenuti i da su krastavci izvor vitamina B kompleksa kojeg sadrže u nešto manjim količinama ali vrlo bitnim za zdravlje čovjeka.

**Tablica 3.** Udio minerala i vitamina u 100 g krastavaca (Lešić i sur., 2002.).

kalij	67-200 mg
fosfor	17-30 mg
kalcij	10-25 mg
natrij	5-13 mg
Vitamin B2	0,015-0,15 mg
Vitamin B3	0,12-1,7 mg
Vitamin B5	0,18-0,30 mg
Vitamin K	0,17 mg
Vitamin C	2-14 mg

Brojna literatura preporučuje sok od krastavca zbog silicijeve kiseline koja iako zastupljena u tragovima vrlo je važna za održavanje zdravlja vezivnog tkiva mišića, ligamenata, hrskavice, kostiju, poboljšava ten i održava zdravlje kože, a zajedno sa vodom prirodno hidratizira i daje koži zdravi sjaj.

#### **1.4. Proizvodnja - Hrvatska i svijet**

Proizvodnja krastavaca u svijetu iz godine u godinu raste što na žalost nije slučaj i kod nas. U Hrvatskoj ne samo da se drastično smanjuju površine pod ovim povrćem već i prinosi stagniraju ili su u padu, što je rezultat malog ulaganja prije svega u hidroponski način proizvodnje.

Analizom priložene tablice 4 vidljivo je da su samo u razdoblju 2006.-2009. god. površine pod krastavicima bile veće od desetogodišnjeg prosjeka, koji je iznosio oko 500-njak hektara zasijanih površina (<http://faostat3.fao.org/>).

Uzevši u obzir činjenicu da je krastavac poslije rajčice i paprike naša najznačajnija povrtlarska kultura vidljivo je koliko su skromni naši trenutni proizvodni kapaciteti.

**Tablica 4.** Površine i prinosi krastavaca u RH u razdoblju 2003.-2012. god.

godina uzgoja	ukupne površine (ha)	ukupan prinos (t)
2003.	534	11 200
2004.	550	10 926
2005.	55	11 122
2006.	812	17 670
2007.	1015	19 207
2008.	744	14 795
2009.	696	14 516
2010.	496	10 894
2011.	430	11 067
2012.	295	6 714

Najveći svjetski proizvođač krastavaca prema dostupnim podacima je Kina koja na 1 150 000 ha proizvede 48 000 000 t krastavaca. Na svjetskoj razini treba još spomenuti i Iran kao drugog najvećeg proizvođača, s 1 600 000 t krastavaca. U Europi su najveći proizvođači krastavaca Rusija, Ukrajina, Turska i Španjolska, čije su uzgojne površine manje ali u postocima s većim prinosom što upućuje na najsuvremenije načine uzgoja (<http://faostat3.fao.org>).

**Tablica 5.** Površine i ukupni prinosi najvećih proizvođača krastavaca u svijetu (2012. god.).

Država	Ukupna površina (ha)	Ukupan prinos (t)
Kina	1 150 000	48 000 000
Iran	70 000	1 600 000
Rusija	68 000	1 281 788
Turska	63 000	1 741 878
Ukrajina	56 800	1 020 600
Španjolska	14 000	713 200
Srbija	8 827	55 356
Hrvatska	295	6 714



## **1.5. Uvjeti uzgoja**

Krastavac najbolje uspijeva na propusnim tlima dobrog vodozračnog odnosa s većim postotkom humusa, a pH vrijednost tla treba biti u granicama neutralne. Gdje god je moguće potrebno je gnojiti stajnjakom (25-50 t/ha) koji će osigurati potrebna hraniva, osigurati stabilnu strukturu i povoljan kapacitet zraka i vode u tlu. Za prinos od 10 t/ha krastavaca potrebno je oko 50 kg N, 16 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 55 kg K<sub>2</sub>O i 10 kg MgO (Lešić i sur., 2002.).

Uz gnojidbu stajnjakom krastavce treba gnojiti i mineralnim gnojivima sa naglaskom na kalij. Krastavac je toplopljubiva biljka osjetljiva na niske temperature, s izraženim temperaturnim zahtjevima tla i zraka. Zbog toga se sjetva ili sadnja na otvorenom polju obavlja nakon moguće pojave kasnih proljetnih mrazeva što je u našim uvjetima uzgoja u mjesecu svibnju. Prema Lešić i sur. (2002.) temperatura tla u sjetvenom sloju treba da iznosi oko 17°C a minimalna temperatura zraka za nicanje sjemena 12°C dok je optimum za normalan vegetativni porast 25-30°C.

Zbog velikih temperaturnih zahtjeva, sve se više na otvorenom polju primjenjuje sadnja iz gotovih presadnica. Za tu svrhu se prema Parađiković (2009.) koriste kocke od treseta, kamene vune ili kokosovog supstrata, tzv. Jiffi kocke dimenzija 10x10 ili 10x12 cm, na način jedna sjemenka u jednu kocku, uzgojene u grijanom zaštićenom prostoru. Ovime se bitno skraćuje vrijeme nicanja sjemena i problemi uvjetovani stresom uslijed pojave kasnih proljetnih mrazeva.

Temperature ispod 10°C utječu na gubitak turgora i žućenja lista a temperature preko 35°C dovode do smanjenja oplodnje i usporavanja rasta plodova. Zbog velike vegetativne mase krastavci imaju velike zahtjeve za vodom koji za vrijeme plodonošenja kada su potrebe za vodom i najveće iznose oko 30 L/m<sup>2</sup> zbog čega je intenzivna proizvodnja nezamisliva bez riješenog sustava navodnjavanja (Lešić i sur., 2002.).

## **1.6. Načini proizvodnje**

Postoje dva osnovna načina uzgoja: uzgoj na otvorenom polju i uzgoj u zaštićenim prostorima. I dok se na otvorenom primjenjuje uzgoj krastavaca za kiseljenje-za potrebe industrije tzv. kornišona, u zatvorenim se prostorima krastavac uzgaja i za industrijsku preradu ali i kao salatni krastavac.

### 1.6.1. Uzgoj na otvorenom

*Sjetva na golom tlu* na otvorenom polju može biti različita i to direktna ili rasađivanje. Međuredni razmak i broj biljaka po jedinici površine ovise od karakteristikama sorte ili hibrida. Kornišoni se siju gušće od salatare o čemu treba voditi računa prilikom mehanizirane berbe. Razmak između redova najčešće je 100-150 cm, a razmak u redu ovisi o načinu sjetve i obično iznosi 20-30 cm. Sije se plitko na 1-2 cm dubine. U jednom kilogramu sjemena ima između 30-40 000 sjemenki, a po jednom hektaru za sjetvu se utroši oko 1-2 kg sjemena, što opet ovisi o kultivaru i načinu uzgoja.

*Uzgoj na tlu s crnom malč folijom* je bolji i sigurniji način uzgoja krastavaca na otvorenom jer folija sprečava nepotrebn gubitak vlage te pojavu korova. Postavljanjem crne folije se postiže i brže zagrijavanje tla u zoni korijena, što je od osobitog značaja za brže i sigurnije nicanja sjemena.



**Slika 2.** Vanjski uzgoj krastavaca na armaturi

Izvor: <http://www.poljoberza.net/>

- *Vertikalan uzgoj na armaturi* - Kako bi se izbjeglo polijeganje postavljaju se različite potpore za vertikalni uzgoj, visine do 180 cm. Iznad svakog reda se razvuče žica s koje se spušta vezivo, koje nakon ukorjenjivanja biljke služi kao potpora za rast. Kao potpore se često koriste i armaturne mreže s veličinom otvora 10x10 cm koje se razvlače duž redova. Sjetva se obavlja u

gredice na razmak 25 do 30 cm, tj. 3 biljke po m<sup>2</sup> pri čemu je razmak između gredica 120-150 cm. Ako se sade presadnice, sadi se po jedna biljka na razmak 30-40 cm (*Slika 2*).

Glavna prednost vertikalnog načina uzgoja u odnosu na onaj klasični horizontalni je značajno smanjenje pojave bolesti i bolja iskorištenost prostora pri čemu se krastavci lakše uočavaju a sama berba je jednostavnija i brža uz veći prinos.

### 1.6.2. Uzgoj u zaštićenim prostorima

Krastavac kao biljka kratkog dana kojoj je za normalan rast i razvoj potrebno manje od 14 sati dnevnog svjetla, idealan je za uzgoj u zaštićenim prostorima tijekom cijele godine, jer je vrlo tolerantan prema nedostatku svjetlosti. Ovo svojstvo krastavaca su prvi prepoznali engleski botaničari koji su krastavce uzgajali kao prve povrtne biljke uzgajane u staklenicima još u 19. stoljeću. Razlikujemo proljetnu, jesensku i zimsku proizvodnju krastavaca u različitim tipovima zaštićenih prostora: niski i visoki tuneli, plastenici i staklenici s različitim načinima grijanja.



**Slika 3.** Uzgoj krastavaca u plasteniku na crnoj malč foliji

Izvor: <http://www.poljoprivredni-forum.com/>

Pri uzgoju u zaštićenim prostorima sjetva se obavlja u kocke od treseta, kamene vune ili kokosovog supstrata (*tzv.* Jiffi kocke dimenzija 10x10 cm ili 10x12 cm). Razmak između redova je 120-150 cm s razmakom biljaka u redu od 40-50 cm u vertikalnom načinu

uzgoja, čime se dobije optimalna iskorištenost prostora s maksimalnim prinosom od čak 200 t/ha (Parađiković, 2009.) (*Slika 3*).

U zaštićenim prostorima se uzgajaju isključivo ženski hibridi. Ovakve hibride nazivamo partenokarpni. Za njih je karakteristično da se oplode bez kukaca pri čemu se iz svakog cvijeta razvije plod čije sjeme daje 100% ženske cvjetove što osigurava siguran i ujednačen prinos. Posebnu pozornost treba obratiti na temperature i relativnu vlažnost zraka, pri čemu se dnevne temperature trebaju kretati u rasponu od 21-27°C, a noćne ne niže od 19°C (Lešić i sur., 2002.).

Do nedavno u zaštićenim prostorima su uzgajane samo salatne sorte ali se danas sve više uzgajaju i krastavci za industrijsku preradu-kornišoni. Od kornišona u našim uvjetima uzgoja koriste se hibridi *Potomac F1*, *Levina F1*, *Royal F1*, *Regal F1*, *Ophix F1*, *Natasja F1*, *Furax F1*, *Renesans F1*, i drugi, a od salatnih sorti *Adrian F1*, *Deltastar F1*, *Flamingo F1*, *Pontia F1*, *Palladium F1*, *Jazzzer F1* (Parađiković, 2009.). Berba krastavaca započinje 30-40 dana nakon sadnje a bere se ručno svaka dva do tri dana, najčešće ujutro i uvečer. Nakon berbe kornišona vrši se klasiranje prema veličini i debljini ploda (*Tablica 6*). Najveću tržišnu vrijednost ima prva klasa ali su njeni prinosi po jedinici površine najmanji.

**Tablica 6.** Klasiranje krastavca s obzirom na dužinu i promjer ploda

Klasa	Dužina (cm)	Promjer (cm)
I	3-6	oko 2
II	6-9	oko 3
III	9-12	oko 4
IV	12-15	oko 4,5

Parađiković (2009.) zaključuje da krastavci plodovima iznose velike količine kalija koji je potrebno nadomjestiti primjenom granuliranih ili tekućih mineralnih gnojiva različitih formulacija (*Tablica 7*). Unos kalija je od naročitog značaja u fenofazi rasta i berbe plodova, kada je potrebno podmiriti velike potrebe krastavaca za ovim hranjivim elementom. Kalij treba dodavati isključivo u obliku K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a izbjegavati KCl oblik, jer je krastavac osjetljiv na Cl<sup>-</sup> ion u otopini tla.

**Tablica 7.** Iznošenje i preporučena količina hraniva za očekivani prinos od 200 t/ha u zaštićenom uzgoju (Parađiković, 2009. - izvor Haifa chemicals).

N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	CaO	MgO
<b>Iznošenje prinosom kg/ha</b>				
220	100	400	50	40
<b>Iznošenje cijelom biljkom tijekom uzgoja kg/ha</b>				
466	204	836	505	135
<b>Preporučena količina gnojiva kg/ha</b>				
559	351	1087	253	135

## 1.7. Sumpor

### 1.7.1. Sumpor u tlu

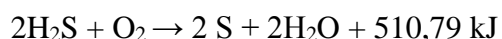
Sumpor kao sekundarni makroelement ulazi u 10 biogenih elemenata značajnih u ishrani mikroorganizama i viših biljaka. U tlu potječe iz matičnih stijena u obliku mineralnih soli, najviše sulfida S<sup>2-</sup> a prilikom njihovog raspadanja oslobađa se i brzo oksidira (Vukadinović i Lončarić, 2007.).

Mikrobiološka transformacija sumpora u tlu (mineralizacija ili sinteza organskih oblika) se odvija u tri faze:

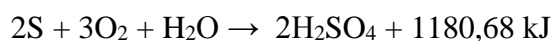
1. *Sulfurifikacija* - mikrobiološki proces u kome se organski spojevi sumpora transformiraju po tipu amonifikacije pri čemu nastaje NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, CO<sub>2</sub>, voda i H<sub>2</sub>S-spoj otrovan za sav živi svijet osim male grupe bakterija koje omogućuju daljnje kruženje sumpora u prirodi: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Microccus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*.

2. *Sulfifikacija* - mikrobiološki i biokemijski proces u kome se H<sub>2</sub>S oksidira do SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Na ovaj način nestaje otrovan spoj i nastaje sulfatni oblik sumpora pogodan za ishranu biljaka i mikroorganizama. Proces se odvija u dvije faze:

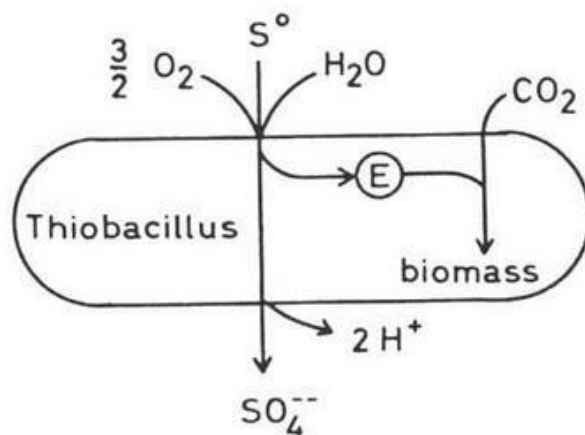
a) sumporifikacija-oksidacija H<sub>2</sub>S do elementarnog sumpora



b) sulfatifikacija-oksidacija elementarnog sumpora do sulfata u tlu i vodi



Mineralizacijom organskih spojeva sumpora do sulfata nastaje oblik sumpora biljni koji biljka ponovo ugrađuje u organsku tvar pa se time kruženje sumpora zatvara. Zahvaljujući ovim sumpornim bakterijama (*Thiobacillus thiooxidans*, *Baggiatoa*, *Thiotrix*, *Thiospirillum*, *Cromatium*) u većini tala ne dolazi do nedostatka sumpora u ishrani biljaka (Vukadinović i Lončarić, 1997.) (Slika 4).



**Slika 4.** Kruženje sumpora u prirodi pomoću sumpornih bakterija

<http://www.spaceship-earth.org/>

3. *Desulfifikacija*-redukcija sulfata do  $H_2S$  u anaerobnim uvjetima (močvare, jezerski mulj, otpadne vode). Za biljnu proizvodnju je redukcija sulfata štetan proces jer povećana količina  $H_2S$  u vodi i tlu dovodi do uginuća biljaka i životinja.

Vukadinović i Lončarić (1997.) navode da se u ocjeditim i prozračnim tlima najveći dio sumpora nalazi u organskoj tvari tla (60-90% ukupnog S). Manji dio anorganskog sumpora može se nalaziti u kiselim uvjetima (pH tla ispod 5,5) vezan na adsorpcijski kompleks, dok je najveći dio S u obliku topljivih i netopljivih soli. Sulfatni anion  $SO_4^-$  je lako pokretljiv u tlu te kao takav podložan ispiranju. Gubitak S iz tla može biti i volatilacijom u redukcijskim uvjetima u obliku  $H_2S$ .

Prema Vukadinović i Lončarić (1997.) na području Hrvatske nema zabilježenog manjka sumpora. Suvišak S u tlu je nepoželjan zbog zakiseljavanja tla (pad pH) i globalno sve je učestaliji zbog kiselih kiša koje se javljaju kao posljedica povećanja industrijske emisije sumpornih plinova.



### 1.7.2. Sumpor u biljkama

Biljke usvajaju sumpor pretežito kao anion  $\text{SO}_4^{2-}$  i u tom obliku nalazi se u protoplazmi biljaka kao mineralna rezerva. Kod ugradnje S u organsku tvar potrebna je redukcija sumpora, međutim do danas nije u potpunosti razjašnjen njegov mehanizam usvajanja. Prema starijim shvaćanjima usvajanje S započinje vezanjem  $\text{SO}_4^{2-}$  na pirofosforilnu grupu ATP-a te nastaje APS (adenozin-fosfosulfat) uz pomoć enzima ATP-sulforilaze. U obliku APS sumpor se usvaja i u biljci reducira do  $-\text{SH}$  grupe koju prihvata acetilserin koji se dalje raspada na cistein i octenu kiselinu pa je stoga cistein primarni proizvod usvajanja sumpora. Novija istraživanja ukazuju na to da se sulfati usvajaju i olakšanom difuzijom u obliku kompleksa s permeazama koje se nalaze u plazmalemi ili na njenoj površini. Koncentracija sumpora u biljkama je između 0,1 i 0,5%, a omjer S:N u proteinima 1:30-40. U mladim biljnim dijelovima S se nalazi pretežito u organskom, reduciranom obliku (90% u formi tripeptida glutationa), a u starijim dijelovima pretežito je oksidiran. Fiziološka funkcija sumpora je vrlo značajna jer je konstituent mnogih vitalnih spojeva. U biljkama sumpor gradi estere sulfatne kiseline ( $\text{R-SO}_3\text{H}$ ) koji su neophodni za sintezu cisteinske kiseline. Aminokiseline sa sumporom cistein ( $\text{R-SH}$ ), metionin ( $\text{R-S-R}$ ) i cistin ( $\text{R-S-S-R}$ ) sadrže oko 50% sumpora u biljkama. Nadalje, sudjeluje u građi mnogih enzima (*proteaze*, *ureaze* i dr.) a sadrže ga i vitamini *biotin* (vitamin H) i *tiamin* (vitamin  $\text{B}_1$ ) te različiti antibiotici. Sumpor sudjeluje i u održavanju oksido-redukcijskih procesa, djeluje na inicijalizaciju diobe stanica, sudjeluje u mehanizmu transporta elektrona te ima značajnu ulogu u održavanju ionske ravnoteže u protoplazmi. Kao bitna činjenica napominje se i značajna uloga sumpora u otpornosti biljaka prema niskim temperaturama i suši (Vukadinović i Lončarić, 1997.).

## 1.8. Cilj istraživanja

1. Utvrditi utjecaj osmoprimiranja sjemena donorima  $H_2S$  na energiju klijanja, ukupnu klijavost te mase hipokotila, korijena i kotiledona kod klijanaca krastavca sorte Levina naklijavanih u prisustvu soli.
2. Analizom fizioloških pokazatelja rasta, utvrditi jesu li klijanci krastavca dobiveni iz sjemena različitih proizvodnih godina te naklijavanog u otopini niske koncentracije NaCl bili pod stresom.
3. Utvrditi da li je tretman sjemena donorima  $H_2S$  značajno utjecao na pokazatelje klijavosti i rasta klijanaca krastavca naklijavanih pri povišenoj razini soli.
4. Utvrditi da li postoji razlika u analiziranim parametrima s obzirom na primijenjeni donor sumporovodika.
5. Utvrditi da li postoje razlike u analiziranim parametrima s obzirom na starost sjemena.

Osnovna hipoteza istraživanja je bila da  $H_2S$  značajno utječe na klijavost i energiju klijanja sjemena krastavca naklijavanog na povišenoj razini soli, te da postoje značajne razlike između primijenjenih donora  $H_2S$ ; NaHS i GYY4137. Analize pokazatelja rasta (energija klijanja, standardna klijavost, mase hipokotila, korjenčića i kotiledona) također bi trebale dati odgovor na pitanje da li tretmani donorima  $H_2S$  mogu povećati vigor starog sjemena.



## 2. PREGLED LITERATURE

Razni oblici abiotskog stresa poput temperaturnih ekstrema, vrlo niske ili visoke pH vrijednosti tla, solnog stresa ili suviška vlage u tlu važni su faktori koji ograničavaju uvjete za normalnu klijavost i rast biljaka te optimalno opskrbljivanje biljnim hranjivima.

Kakvoća sjemena je kompleksno svojstvo koje ovisi o velikom broju čimbenika. Prema Marcos-Filho i McDonald (1998.) kakvoću sjemena čine njegova genetska, fizikalna, fiziološka i zdravstvena svojstva na koju utječu kako agroekološki uvjeti tijekom vegetacije (McDonald, 1998.), tako i sam proces dorade (Schaffer i Vanderlip, 1999.) i skladištenja sjemena (Vieira i sur., 2001.).

Klijanje je ključna faza rasta u životnom ciklusu biljke. Ubrzana i homogena klijavost potrebna je za dobivanje snažnog i zdravog usjeva a učinkovito korištenje sjemene pričuve na kraju će dovesti do povećanja prinosa (Harris, 1996.).

Klijavost sjemena se utvrđuje standardnom metodom naklijavanja, odnosno u idealnim uvjetima vlage i temperature (TeKrony i sur., 1987.; Siddique i Wright, 2004.), a vrijednosti standardne klijavosti često premašuju poljske uvjete nicanja (Hamman i sur., 2002.), posebno kada su u pitanju ekstremne vrijednosti pH reakcije tla.

Standardna klijavost i energija klijanja glavni su pokazatelji fiziološke kvalitete sjemena te neizostavni parametri za određivanje norme sjetve u cilju postizanja željenog sklopa biljaka u polju pa su kao takvi naišli na široku primjenu u praksi. Standardna klijavost predstavlja broj normalnih klijanaca prema ukupnom broju sjemenki stavljenih na naklijavanje. Energija klijanja predstavlja brzinu i ujednačenost kojom sjeme klija. To je jedan od važnih pokazatelja kvalitete sjemena, jer što je klijanje brže, postići će se bolji rezultati u sjetvi, bolje i ujednačenije nicanje biljaka, bujniji razvoj, veća otpornost na utjecaje vanjske sredine, ali i bolesti i štetnike, jer razvijenije biljke pokazuju bolju otpornost na različite činitelje stresa (Lisjak i sur., 2009.).

Snažne i dobro razvijene sadnice tolerantnije su na neke od brojnih biotičkih i abiotičkih stresova koji u različitim fazama razvoja štetno djeluju na biljku. Takve sadnice mogu uspješnije prevladati nepovoljne ekološke uvjete rasta i razvoja (Lütke-Entrup i Oehmichen, 2000.).

Masovna uporaba mineralnih gnojiva dovodi do sve veće zaslanjenosti tla koja se smatra jednim od glavnih uzročnika abiotskog stresa i kao takva značajan je faktor koji utječe na biljnu

proizvodnju u cijelom svijetu, posebno u sušnim i polusušnim regijama svijeta (Pahoja i sur., 2013.; Khajeh-Hosseini i sur., 2003.; Neumann, 1995.; Shannon, 1998.; Davidson i Chevalier, 1987.; Srivastava i Jana, 1984.).

Epstein i sur. (1980.), navode kako solni stres nepovoljno utječe na produktivnosti biljke u svim fazama rasta. Zaslanjenost tla i suša su primarni uzrok smanjenja prinosa agrikulturnih biljaka širom svijeta a ujedno i prevladavajući faktor koji ograničava produktivnost ali i geografsku rasprostranjenost biljaka (Vinocur i Altman, 2005.). Prema predviđanju Smith i sur. (2010.), do 2050. godine na globalnoj razini problemom zaslanjenosti biti će obuhvaćeno oko 50% svih svjetskih obradivih površina. Türkan i Demiral (2009.) također smatraju da solni stres predstavlja najveću ekološku prijetnju poljoprivredi, naročito u područjima gdje se zaslanjena voda koristi za navodnjavanje.

Negativni utjecaj solnog stresa, bilo da se radi o zaslanjenosti tla ili hidroponske otopine, manifestira se kroz narušavanje ionske ravnoteže žive stanice zbog smanjenja sposobnosti biljaka da usvoje vodu, ometanja procesa osmoze uslijed povećanja koncentracije soli ili zbog samog kemijskog svojstva ionske toksičnosti kationa soli  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  koji inaktiviraju i vežu na sebe pristupačne molekule vode (Khajeh-Hosseini i sur., 2003.). Uslijed ovakvih uvjeta u tlu veže se fiziološke aktivna voda što se direktno manifestira smanjenjem intenziteta rasta biljaka (Munns, 2002.). Alorman (2013.) navodi da se zaslanjenost tla općenito povećava sa smanjenjem rata navodnjavanja agrikulturnih biljaka, naročito u sušnim područjima.

Namakanje sjemena u vodi stimulira razne biokemijske promjene u sjemenu koje su bitne za pokretanje klijavosti i aktivaciju određenih enzima bitnih za prekidanje dormantnosti (Ajouri i sur., 2004.). Postoji nebrojeni dokazi koji negativne korelacije različitih abiotskih vrsta stresa (saliniteta, nedostatka vode ili stresa uzrokovanog uslijed visokih i niskih temperatura) povezuju s pozitivnim učinkom osmoprimiranja koji dovodi do staničnih, substaničnih i molekularnih promjena u sjemenu te povećanja vigora sjemena tijekom klijanja različitih biljnih vrsta (McDonald, 2000.; Numjun i sur., 1997.). Osmoprimiranje je tehnika tretiranja sjemena kojom se djelomično ili u potpunosti sjeme hidrira s vodom ili različitim osmotskim otopinama poput polietilen glikola ili npr. solima poput  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{NaCl}$  kroz određeno vrijeme, nakon čega se suši prije izbijanja radikule i same sjetve (McDonald, 2000.). U konačnici, na takav način se potiče metabolička aktivnosti sjemena i pospješuje njegovo klijanje. Osim što osmoprimiranje učinkovito povećava vigor te poboljšava klijanje sjemena,

biljke razvijene iz takvog sjemena ranije ulaze u faze cvatnje i sazrijevanja, što se u konačnici reflektira na povećanje prinosa (Basra i sur., 2005.).

Patade i sur. (2011.) također potvrđuju da osmoprimiranje poboljšava klijavost sjemena, stimulira i pospješuje vegetativni rast i povećava prinos usjeva, te povećava otpornost na različite oblike stresa kod mnogih ratarskih kultura poput pšenice (Iqbal i Ashraf, 2007.), pamuka (Casenave i Toselli 2007.), leće (Ghassemi-Golezani i sur., 2008.a), kukuruza (Foti i sur., 2008.), šećerne trske (Patade i sur., 2009.) i krastavaca (Ghassemi-Golezani i Esmaeilpour, 2008.). Kaya i sur. (2006.) u svom istraživanju također zaključuju da osmoprimiranje sjemena povećava toleranciju na solni stres kod suncokreta (*Helianthus annuus* L.), dinje (*Cucumis melo* L.) i rajčice (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

Ghassemi-Golezani (2008.) su istraživali utjecaj otopina soli kalij nitrata i natrij klorida (3% KNO<sub>3</sub> tijekom 3 dana i 1% NaCl tijekom 2 dana) u kontroliranim uvjetima na 20°C na klijanje sjemena dva kultivara krastavaca Basmenji i Varamin. U svim varijantama, osmoprimiranje sjemena s 3% otopinom KNO<sub>3</sub> je bilo učinkovitije od otopine 1% NaCl. Utjecaj blagog solnog stresa osmoprimiranjem sjemena 3% otopinom KNO<sub>3</sub> je pozitivno utjecalo na klijavost sjemena krastavaca naročito u uvjetima niskih temperatura u rano proljeće.

Prema istraživanjima Neamatollahi i sur. (2009.) postoje razlike između otopina soli koje uzrokuju solni stres. U uvjetima istog vodnog potencijala ispitivan je utjecaj dviju natrijevih soli NaCl i Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na klijavost sjemena i parametre rasta klijanaca kumina (*Cuminum cyminum* L.). Obje su primijenjene soli smanjile klijavost sjemena te usporile rast klijanaca stoga autori inhibitorno djelovanje različitih otopina natrijevih soli istog vodenog potencijala pripisuju ponajprije toksičnom djelovanju iona koji su u njihovu sastavu, prije nego osmotskom potencijalu samih otopina.

Nasri i sur. (2011.) u svojim istraživanjima ispituju utjecaj osmoprimiranja sjemena s 0,05% otopinom KNO<sub>3</sub> na postotak klijavosti, pokazatelje rasta i aktivnost fosfataza u mladim klijanima salate, naklijavane u uvjetima solnog stresa. Rezultati ovih autora pokazali su da klijanci dobiveni iz prethodno osmoprimiranog sjemena naklijavanog u prisustvu 100 mM otopine NaCl imaju veći postotak klijavosti, duže korijene i hipokotile te veću svježu masu u odnosu na klijance uzgojene iz netretiranog sjemena. Osim toga, u tretiranom sjemenu je utvrđena povećana aktivnost fosfataza, ključnih enzima koji reguliraju energetske procese stanice regulacijom razine anorganskog fosfora, a što pozitivno utječe na efikasnije prevladavanje negativnog utjecaja solnog stresa te se ovaj efekat manifestira kroz povećanje

klijavosti i brži rast mladih klijanaca.

Song (2013.) navodi da se postotak klijavosti sjemena krastavaca (*Cucumis sativus* L.) nije bitno mijenjao u uvjetima solnog stresa kada je sadržaj topivih soli bio manji od 3 g/kg. Međutim povećanjem sadržaja soli u tlu iznad prethodno navedene koncentracije postotak klijavosti se značajno smanjuje te pri koncentracijama iznad 10 g/kg klijavost u potpunosti izostaje. Provedenim istraživanjem dokazano je da postoji statistički značajna negativna povezanost između klijavosti sjemena i sadržaja topive soli u tlu što dovodi do zaključka da se u uvjetima solnog stresa, klijanje i rast krastavca može predvidjeti određivanjem sadržaja soli u tlu.

Odavno je poznato da povećane koncentracije sumporovodika ( $H_2S$ ) djeluju fitotoksično (Koch i sur., 1990.; Dorman i sur., 2002.). Njegova štetnost pri visokim koncentracijama te dokazano toksično djelovanje na biološke sustave bila je razlog njegovog zapostavljanja u znanstvenim istraživanjima o mogućim pozitivnim učincima koje  $H_2S$  može imati na čovjeka i biljke.

Biljke su neprestano izložene djelovanju ovog spoja, jer je on neprestano prisutan u okolišu. Porijeklo mu može biti vrlo različito, kao i koncentracije u kojima je zastupljen. U močvarnim tlima u uvjetima anoksije, dokazana je povećana produkcija ovog plina te je korijenje biljaka koje raste u takvim uvjetima izloženo njegovu djelovanju (Morse i sur., 1987.). Atmosferski  $H_2S$  kojemu su izloženi nadzemni dijelovi biljke može potjecati iz mnogih izvora poput kolektora i pročistača otpadnih gradskih voda (Zhang i sur., 2008.b), poljoprivredne industrije (Aneja i sur., 2008.), a također su povećane koncentracije utvrđene i u urbanim sredinama gdje mu je porijeklo iz ispušnih plinova automobila (Kourtidis i sur., 2008.).

Osim što su biljke neprestano izložene djelovanju sumporovodika, Wilson i sur. (1978.) su u svojim istraživanjima provedenim na krastavcu, tikvici, bundevi, soji, pamuku, dokazali da ga biljke mogu i same reproducirati. Emisija  $H_2S$  bila je značajno povećana u uvjetima kada su listovi bili izložen i svjetlu te kada je korijen tretiran sulfatom. Osim tretmana sulfatom, dokazano je i da tretman drugim sumpornim spojevima može utjecati na emisiju  $H_2S$ . Tako su npr. Hällgren i Fredriksson (1982.) dokazali mjerljivu emisiju  $H_2S$  u iglicama *Pinus silvestris* (L.), izloženim niskim koncentracijama  $SO_2$ , dok je Rennenberg (1983.) pri tretmanima listova bundeve sulfitom i cisteinom također primijetio otpuštanje  $H_2S$  te zaključio da su uključeni drukčiji metabolitički putevi s obzirom na dodani oblik sumpornih spojeva.

Međutim, promjena pristupa u proučavanju uloge H<sub>2</sub>S u biljnim stanicama, u kojem se on prestao promatrati isključivo kao fitotoksin, dovela je do sve većeg broja znanstvenih istraživanja u kojima je potvrđena vrlo važna uloga ovog spoja pri niskim koncentracijama te pozitivan fiziološki učinak na rast i razvoj biljaka, na povećanje klijavosti te otpornosti na različite oblike biotskih (teški metali, povećane koncentracije soli, nedostatak vode) ali i biotskih činitelja stresa (patogeni organizmi, kukci itd.) (Li, 2013.).

Istraživanja autora koji su listove više vrsti agrikulturnih biljaka *Impatiens Walleriana* Hook., *Vicia faba* L., *Capsicum annuum* L. te model biljke *A. thaliana*, tretirali donorima H<sub>2</sub>S različitih kemijskih svojstava te u različitim koncentracijama, dokazala su značajan utjecaj navedenog spoja i na mehanizme regulacije rada puči (García-Mata i Lamattina 2010.; Desikan 2010.; Lisjak i sur., 2010.; Lisjak 2012.).

Zhang i sur. (2009.b) su dokazali da niže koncentracije H<sub>2</sub>S (0,5%), sumporne komponente proizašle iz 0,2 mM NaHS, stimulativno djeluju na formiranje i rast korijena batata (*Ipomoea batatas* L.) i soje (*Glycine max* L. Merrill.). Osim toga, NaHS kao donor H<sub>2</sub>S može smanjiti i osmotski inducirani pad koncentracije klorofila u batatu (Zhang i sur., 2009.a).

Također je dokazano da H<sub>2</sub>S ima i važnu antioksidativnu ulogu u metabolizmu te sudjeluje u smanjenju štetnog učinka stresa izazvanog povećanom pristupačnošću metalnih kationa. Zhang i sur. (2008.a) su u svojim istraživanjima na mladim klijancima pšenice dokazali kako tretman sjemena pšenice s NaHS naklijavane pri povišenoj koncentraciji bakra, smanjuje njegov inhibitorski učinak na klijanje. U ovom ali i drugim istraživanjima navedene grupe autora, ispitivani su i specifični neenzimatski i enzimatski pokazatelji stresa (aktivnost katalaze, superoksid-dizmutaze, askorbat-peroksidaze, gvajakol-peroksidaze, esteraze, amilaze, lipoksigenaze, koncentracije peroksida i malondialdehida) u stanicama te je dokazano kako H<sub>2</sub>S može povećati antioksidativni kapacitet u stanicama i time smanjiti štetne učinke uslijed osmotskog stresa te stresa izazvanog povećanom pristupačnošću kationa metala (Zhang i sur., 2008.a, 2010.a, 2010.).

Paralelno s ispitivanjem osmotskog stresa Zhang i sur. (2010.a) istražuju kakav utjecaj H<sub>2</sub>S ima na klijavost i rast sjemena pšenice (*Triticum aestivum* L.) uslijed stresa izazvanog toksičnim djelovanjem aluminija. Rezultati istraživanja su pokazali da visoke koncentracije AlCl<sub>3</sub>, imaju inhibitorski učinak na klijanje i rast pšenice ali su posljedice štetnog djelovanja Al<sup>3+</sup> značajno smanjene kod sjemena tretiranog s NaHS. Također su dokazali da je tretman NaHS uzrokovao povećanje endogenog H<sub>2</sub>S u stanicama te smanjio usvajanje aluminija. Nadalje, ostale

ispitivane natrijeve soli koje sadrže sumpor nisu bile toliko učinkovite u smanjenju štetnog djelovanja  $\text{Al}^{3+}$  iona. Ovi rezultati ukazuju na to da  $\text{H}_2\text{S}$  ima sposobnost svojevrsnog antioksidansa u sjemenu pšenice što dovodi do ublažavanja stresa uzrokovanog povećanim koncentracijama navedenog metala.

Wei (2010.) također istražuje utjecaj tretmana sjemena pšenice s NaHS na povećanje klijavosti te fiziološke (enzimatske i neenzimatske) pokazatelje stresa kod klijanaca uzgajanih u uvjetima povećane koncentracije natrij klorida i pristupačnih  $\text{Al}^{3+}$  iona. Naklijavanje u prisustvu 160 mM otopine NaCl, rezultiralo je smanjenjem postotka iskljanih biljaka za 50% u usporedbi s kontrolnim uzorkom, a porast klicinog korjenčića se značajno smanjio. Uočeno je da solni stres inhibira klijanje sjemena te rast korjenčića i koleoptile te je ovaj efekat bio izraženiji s povećanjem koncentracije soli. Međutim, tretman s NaHS je značajno ublažio inhibicijski učinak NaCl. Slični je negativni učinak na klijanje rast i razvoj imao i tretman s 30 mM  $\text{AlCl}_3$  te je pri ovoj koncentraciji, uz smanjenje klijavosti na 50%, porast radikule bio gotovo potpuno zaustavljen. Na temelju dobivenih rezultata autori zaključuju da NaHS, ovisno o primijenjenoj koncentraciji, može smanjiti inhibitorni učinak bilo da se radi o solnom stresu ili pak o stresu izazvanom toksičnom koncentracijom  $\text{Al}^{3+}$  iona te se najučinkovitijim pokazao predtretman sjemena s 1,2 mM NaHS. Analizom enzimatskih i neenzimatskih pokazatelja stresa je utvrđeno da  $\text{H}_2\text{S}$  utječe na pojačanje ekspresije antioksidativnih enzima što u konačnici rezultira smanjenjem negativnog učinka stresa na staničnoj i molekularnoj razini, a što se nadalje reflektira na sam rast i razvoj biljke.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Postavljanje pokusa i korištena oprema

Sjeme krastavca (*Cucumis sativus* L.) sorte "Levina" je prije naklijavanja imbibirano u otopinama donora sumporovodika, NaHS (natrij hidrogen sulfid) i GYYY4137 (morfolin-4-ium 4 metoksifenil (morfolino) fosfinoditioat). Odvagano je po 200 sjemenki, odbrojano u plastične epruvete od 50 mL te su dodani jednaki volumeni otopina GYY4137 odnosno NaHS, u koncentracijama od 300  $\mu$ M. Sjeme je imbibirano u navedenim otopinama 12 sati, nakon čega je osušeno na filter papiru pri sobnoj temperaturi naredna 24 sata, nakon čega je ponovno odvagano.

Po 50 sjemenki je naklijavano na vlažnom ubrusu navlaženom s 150 mL destilirane vode za varijantu kontrola odnosno 150 mL otopine NaCl, EC vrijednosti podešene na 2,81 mS/cm što je odgovaralo koncentraciji od 25 mM za varijantu u kojoj je ispitivan fiziološki efekt NaCl. Pokus je postavljen u 4 ponavljanja (Slika 5).



**Slika 5:** Postavljanje pokusa

Navlaženi ubrusi su nakon postavljanja sjemenki, nježno smotani u tuljke, prebačeni u najlonske vrećice te zatvoreni zbog sprječavanja gubitka vlage i postavljeni u uspravnom položaju u vertikalnu klima komoru (Frigomat) na temperaturu od 20°C, u mraku.

### **3.2. Određivanje energije klijanja i standardne klijavosti**

Četvrti dan od dana postavljanja pokusa je izbrojano isklijalo sjeme, te je iz tih podataka izračunata energija klijanja (EK) u postotcima, u odnosu prema ukupnom broju sjemenki postavljenih na naklijavanje za svaki primjenjeni tretman.

Osmi dan od dana postavljanja pokusa prebrojavanjem iskljalih, zdravih i razvijenih klijanaca utvrđena je standardna klijavost (SK) u postotcima prema ukupnom broju sjemenki postavljenih na naklijavanje za svaki primjenjeni tretman.

### **3.3. Određivanje mase hipokotila, korijena i kotiledona**

Nakon određivanja SK, izvagane su ukupne mase klijanaca, a nakon odvajanja hipokotila, korjenčića i kotiledona ponovno su izvagane mase navedenih dijelova klijanaca krastavca.

### **3.4. Obrada podataka**

Pokus je postavljen u četiri ponavljanja sa po 50 klijanaca po ponavljanju. Ispitivan je utjecaj slijedećih faktora na molekularne pokazatelje stresa: proizvodna godina sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.), osmoprimiranje sjemena donorima H<sub>2</sub>S (NaHS i GYY4137), te solni stres (kontrola - destilirana voda, NaCl - EC otopine podešen na 2,81 mS/cm). Svi utvrđeni rezultati su analizirani uobičajenim metodama statističke obrade podataka pomoću SAS Software 9.1.3, programske podrške (2002.-2003., SAS Institute Inc., Cary, USA) i Microsoft Office Excell 2010. Korištene su slijedeće statističke metode: analiza varijance (ANOVA), statistički testovi značajnosti utjecaja primjenjenih tretmana – F test i Fisher's LSD test (eng. Least Significant Difference) te pojedinačna i multipla linearna korelacijska analiza.



#### 4. REZULTATI

Prema F testu, u prosjeku za sve varijante osmoprimiranja i naklijavanja sjemena krastavaca, godina proizvodnje sjemena je značajno utjecala na energiju klijanja ( $P=0,0001$ ), standardnu klijavost te mase hipokotila, korijena i kotiledona ( $P\leq 0,0001$ ; *Tablica 8*).

**Tablica 8.** Značajnost utjecaja godine proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.), i osmoprimiranja sjemena donorima H<sub>2</sub>S (300  $\mu$ M GYY4137, 300  $\mu$ M NaHS), solnog stresa u klijanju (kontrola i NaCl) i njihovih interakcija na energiju klijanja (EK), standardnu klijavost (SK) (%), masu hipokotila (mHIP), kotiledona (mKOT) i korijena (mKOR) (g/biljci).

FAKTOR	VARIJANTA	EK	SK	mHIP	mKOT	mKOR
Godina proizvodnje sjemena	2009./2010.	95 B	92 B	0,255 A	0,055 A	0,051 A
	2010./2011.	98 A	97 A	0,243 B	0,051 B	0,051 A
	2011./2012.	98 A	98 A	0,209 C	0,041 C	0,042 B
	F test	12,01	15,64	35,04	203,78	19,10
	P	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Osmoprimiranje sjemena	NaHS	97	96	0,235	0,050 A	0,048
	GYY4137	97	96	0,236	0,048 B	0,048
	F test	0,01	0,08	0,03	4,21	0,39
	P	0,9186	0,7762	0,8625	0,0474	0,5372
Solni stres u klijanju	Kontrola	98	96	0,223 B	0,049	0,047
	NaCl	97	95	0,248 A	0,049	0,049
	F test	1,82	3,17	28,79	2,12	3,96
	P	0,1854	0,0835	<0,0001	0,1537	0,0543
Godina x Osmoprimiranje	F test	1,11	1,16	4,25	1,50	2,60
	P	0,3421	0,3259	0,0220	0,2364	0,0879
Godina x Stres	F test	1,89	0,33	0,07	7,48	0,17
	P	0,1657	0,7214	0,9324	0,0019	0,8471
Osmoprimiranje x Stres	F test	0,12	0,70	0,12	0,02	1,21
	P	0,7339	0,4080	0,7328	0,8783	0,2777
Godina x Osmoprimiranje x Stres	F test	0,53	1,27	1,31	2,19	1,18
	P	0,5926	0,2923	0,2833	0,1267	0,3180

\*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (A,B,C;  $P=0,05$ ).

Prema rezultatima LSD testa, u prosjeku za obje varijante osmoprimiranja sjemena i naklijavanja, sjeme iz proizvodne godine 2009./2010. je imalo statistički značajno nižu energiju klijanja (95%) i standardnu klijavost (92%), dok se sjeme iz proizvodnih godina 2010./2011. (EK 98%; SK 97%) te 2011./2012. (EK 98%; SK 98%), nije međusobno značajno razlikovalo u navedena dva pokazatelja vigora sjemena. Kod klijanaca naklijanih iz sjemena proizvodne godine 2009./2010. je utvrđena statistički značajno najviša masa hipokotila (0,255 g/biljci) i kotiledona (0,055 g/biljci). Klijanci dobiveni iz najmlađeg sjemena su imali statistički značajno

najnižu masu hipokotila (0,209 g/biljci), kotiledona (0,041 g/biljci) te korijena (0,042 g/biljci). Mase korijena kod klijanaca iz proizvodnih godina 2009./2010. te 2010./2011. se nisu međusobno značajno razlikovale (0,051 g/biljci).

U prosjeku za sve proizvodne godine sjemena te obje varijante naklijavanja, F testom je utvrđen značajan utjecaj varijante osmopriranja samo kod mase kotiledona ( $P=0,0474$ ), dok na ostale pokazatelje vigora sjemena osmopriranje nije značajno utjecalo.

U prosjeku za sve godine proizvodnje sjemena i obje varijante naklijavanja, LSD testom je utvrđena značajno viša masa kotiledona kod klijanaca sjemena osmopriranog s NaHS (0,050 g/biljci) u odnosu na masu utvrđenu pri tretmanu s GYY4137 (0,048 g/biljci).

U prosjeku za sve proizvodne godine sjemena te obje varijante osmopriranja, F testom je utvrđen značajan utjecaj varijante naklijavanja na masu hipokotila ( $P<0,0001$ ), te je LSD testom utvrđena značajno viša masa pri tretmanu s NaCl (0,248 g/biljci) u usporedbi na kontrolu (0,223 g/biljci). Na ostale pokazatelje vigora sjemena varijanta naklijavanja nije značajno utjecala.

Ispitivanjem značajnosti interakcija, F testom je utvrđen značajan utjecaj interakcije godina x osmopriranje samo na masu hipokotila ( $P=0,0220$ ), dok interakcije osmopriranje x godina, osmopriranje x stres te trostruka interakcija godina x osmopriranje x stres nisu značajno utjecale ni na jedan od ispitivanih pokazatelja vigora sjemena.

U prosjeku za obje varijante naklijavanja sjemena, F testom je utvrđen značajan utjecaj godine proizvodnje sjemena na energiju klijanja i standardnu klijavost pri varijanti osmopriranja sjemena s GYY4137 (EK  $P=0,0015$ ; SK  $P=0,0007$ ) dok je osmopriranje s NaHS značajno utjecalo samo na standardnu klijavost ( $P=0,0215$ ) (*Tablica 9*).

LSD testom je utvrđena značajno niža standardna klijavost pri sjemenu iz proizvodne godine 2009./2010. pri obje varijante osmopriranja (SK NaHS 93%; GYY4137 92%), dok je sjeme iz proizvodnih godina 2010./2011. te 2011./2012. pokazalo statistički značajnu višu klijavost u obje varijante osmopriranja (u prosjeku od 97% – 99%) te se nije međusobno statistički značajno razlikovalo u ova dva ispitivana parametra. Također je i energija klijanja najstarijeg sjemena osmopriranog s GYY4137 bila značajno niža (94%) u usporedbi s preostale dvije godine deklaracije sjemena (2010./2011. 98%; 2011./2012. 99%).

U prosjeku za sve godine proizvodnje sjemena, uvjeti naklijavanja nisu značajno utjecali na energiju klijanja i standardnu klijavost ni u jednoj varijanti osmoprimiranja sjemena kao ni interakcija godina x stres.

**Tablica 9.** Značajnost utjecaja godine proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.), solnog stresa u klijanju (kontrola i NaCl) i njihovih interakcija pri različitim varijantama osmoprimiranja sjemena donorima H<sub>2</sub>S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS) na energiju klijanja (EK) i standardnu klijavost (SK) (%).

FAKTOR	VARIJANTA	EK		SK	
		NaHS	GYY4137	NaHS	GYY4137
Godina proizvodnje sjemena	2009./2010.	95	94 B	93 B	92 B
	2010./2011.	98	98 A	97 A	97 A
	2011./2012.	98	99 A	97 A	99 A
	F test	3,13	9,56	4,79	11,32
	P	0,0681	0,0015	0,0215	0,0007
Stres u klijanju	Kontrola	98	98	96	97
	NaCl	97	97	95	95
	F test	0,54	1,34	0,50	3,10
	P	0,4704	0,2616	0,4898	0,0954
Godina x Stres	F test	0,54	1,80	0,26	1,24
	P	0,5947	0,1935	0,7755	0,3129

\*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (A,B,C;  $P=0,05$ ).

U prosjeku za obje varijante naklijavanja, F testom je utvrđen značajan utjecaj godine proizvodnje sjemena na mase hipokotila, kotiledona i korijena pri obje varijante osmoprimiranja sjemena (mHIP: NaHS  $P=0,0021$  i GYY4137  $P<0,0001$ ; mKOT: NaHS i GYY4137  $P<0,0001$ ; mKOR: NaHS  $P=0,0135$  i GYY4137  $P=0,0002$ ) (Tablica 10).

U prosjeku za obje varijante naklijavanja, LSD testom su utvrđene značajno najviše mase hipokotila pri tretmanu s GYY4137 (0,264 g/biljci) kod klijanaca iz najstarijeg sjemena proizvodne godine 2009./2010. te najviše mase kotiledona pri oba tretmana donorima H<sub>2</sub>S (NaHS 0,055; GYY4137 0,055) dok su klijanci dobiveni iz sjemena proizvodne godine 2011./2012. pri istim ovim tretmanima imali statistički značajno niže mase hipokotila (mHIP: GYY4137 0,202 g/biljci) i kotiledona (mKOT: NaHS 0,043 g/biljci i GYY4137 0,040 g/biljci). Masa hipokotila u tretmanu s NaHS bila je značajno niža kod klijanaca iz sjemena proizvodne godine 2011./2012. (0,217 g/biljci) u usporedbi s starijim sjemenom iz proizvodnih godina 2009./2010. (0,246 g/biljci) i 2010./2011. (0,244 g/biljci), koje se međusobno nije statistički značajno razlikovalo u navedenom pokazatelju. Masa korijena u obje varijante osmoprimiranja

sjemena donorima H<sub>2</sub>S je također bila značajno niža kod klijanaca iz sjemena proizvodne godine 2011./2012. (NaHS 0,044 g/biljci i GYY4137 0,039 g/biljci), dok se sjeme iz proizvodnih godina 2009./2010. (NaHS 0,051 g/biljci i GYY4137 0,052 g/biljci) i 2010./2011. (NaHS 0,050 g/biljci i GYY4137 0,052 g/biljci) nije statistički značajno razlikovalo.

**Tablica 10.** Značajnost utjecaja godine proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.), solnog stresa u klijanju (kontrola i NaCl) i njihovih interakcija pri različitim varijantama osmoprimiranja sjemena donorima H<sub>2</sub>S (300  $\mu$ M GYY4137, 300  $\mu$ M NaHS) na masu hipokotila (mHIP), masu kotiledona (mKOT) i masu korijena (mKOR) (g/biljci).

FAKTOR	VARIJANTA	mHIP		mKOT		mKOR	
		NaHS	GYY4137	NaHS	GYY4137	NaHS	GYY4137
Godina proizvodnje sjemena	2009./2010.	0,246 A	0,264 A	0,055 A	0,055 A	0,051 A	0,052 A
	2010./2011.	0,244 A	0,242 B	0,051 B	0,051 B	0,050 A	0,052 A
	2011./2012.	0,217 B	0,202 C	0,043 C	0,040 C	0,044 B	0,039 B
	F test	8,87	29,01	109,80	98,04	5,52	13,69
	P	0,0021	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0135	0,0002
Solni stres u klijanju	Kontrola	0,222 B	0,225 B	0,049	0,048	0,048	0,045
	NaCl	0,249 A	0,248 A	0,050	0,049	0,049	0,049
	F test	17,53	11,78	1,09	1,07	0,57	3,66
	P	0,0006	0,0030	0,3113	0,3154	0,4614	0,0718
Godina x Stres	F test	0,99	0,43	11,35	0,65	0,34	0,86
	P	0,3907	0,6599	0,0006	0,5352	0,7192	0,4418

\*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (A,B,C;  $P=0,05$ ).

U prosjeku za obje varijante osmoprimiranja sjemena, F testom je utvrđen značajan utjecaj godine proizvodnje sjemena na energiju klijanja i standardnu klijavost kod kontrolnih biljaka i kod klijanaca naklijavanih u prisustvu otopine NaCl (EK: NaCl  $P=0,0040$  i kontrola  $P=0,0082$ ; SK NaCl  $P=0,0063$  i kontrola  $P=0,0014$ ) (Tablica 11). U prosjeku za sve ispitivane godine proizvodnje sjemena, F testom nije utvrđen značajan utjecaj osmoprimiranja sjemena na energiju klijanja i standardnu klijavost, a također nije potvrđen signifikantan utjecaj interakcije godina x osmoprimiranje.

LSD testom su utvrđene značajne razlike u navedena dva parametra te je očekivano, najstarije sjeme iz proizvodne godine 2009./2010. pri oba uvjeta naklijavanja imalo značajnu najnižu energiju klijanja (NaCl 94% i kontrola 95%) i standardnu klijavost (NaCl 92% i kontrola 92%). Sjeme iz proizvodnih godina 2010./2011. i 2011./2012. se nije značajno razlikovalo u navedena dva parametra.

**Tablica 11.** Značajnost utjecaja godine proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.), osmoprimiranja sjemena donorima H<sub>2</sub>S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS) i njihovih interakcija pri solnom stresu u klijanju (kontrola i NaCl) na energiju klijanja (EK) i standardnu klijavost (SK) (%).

FAKTOR	VARIJANTA	EK		SK	
		NaCl	K	NaCl	K
Godina proizvodnje sjemena	2009./2010.	94 B	95 B	92 B	92 B
	2010./2011.	97 A	100 A	96 A	98 A
	2011./2012.	99 A	98 A	98 A	98 A
	F test P	7,61 0,0040	6,35 0,0082	6,81 0,0063	9,66 0,0014
Osmoprimiranje sjemena	NaHS	97	98	95	96
	GYY4137	97	98	95	97
	F test P	0,10 0,7503	0,03 0,8705	0,13 0,7236	0,77 0,3931
	F test P	1,49 0,2509	0,21 0,8154	1,74 0,2035	0,46 0,6362

\*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (A,B,C;  $P=0,05$ ).

U prosjeku za obje varijante osmoprimiranja sjemena, utvrđen je značajan utjecaj godine starosti sjemena na mase hipokotila, kotiledona i korijena pri obje varijante naklijavanja sjemena (mHIP i mKOT: NaCl i kontrola  $P<0,0001$ ; mKOR: NaCl  $P=0,0012$  i kontrola  $P=0,0018$ ) (Tablica 12). Interakcija godina x osmoprimiranje je značajno utjecala samo na masu hipokotila pri naklijavanju sjemena u prisustvu NaCl ( $P=0,0176$ ).

**Tablica 12.** Značajnost utjecaja godine proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.), osmoprimiranja sjemena donorima H<sub>2</sub>S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS) i njihovih interakcija pri solnom stresu u klijanju (kontrola i NaCl) na masu hipokotila (mHIP), kotiledona (mKOT) i korijena (mKOR) (g/biljci).

FAKTOR	VARIJANTA	mHIP		mKOT		mKOR	
		NaCl	K	NaCl	K	NaCl	K
Godina proizvodnje sjemena	2009./2010.	0,267 A	0,243 A	0,054 A	0,055 A	0,053 A	0,050 A
	2010./2011.	0,254 A	0,232 A	0,051 B	0,051 B	0,053 A	0,049 A
	2011./2012.	0,223 B	0,196 B	0,043 C	0,039 C	0,043 B	0,041 B
	F test P	16,43 <0,0001	18,65 <0,0001	53,72 <0,0001	190,74 <0,0001	9,98 0,0012	9,22 0,0018
Osmoprimiranje sjemena	NaHS	0,249	0,222	0,050	0,049	0,049	0,048
	GYY4137	0,248	0,225	0,049	0,048	0,050	0,045
	F test P	0,01 0,9054	0,13 0,7196	1,45 0,2440	3,21 0,0898	0,10 0,7503	1,65 0,2149
	F test P	5,10 0,0176	0,50 0,6121	2,91 0,0803	0,10 0,9073	3,10 0,0697	0,42 0,6632

\*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (A,B,C;  $P=0,05$ ).

U prosjeku za obje varijante tretmana sjemena donorima H<sub>2</sub>S, LSD testom je utvrđena značajno veća masa hipokotila i korijena u kontroli i u prisustvu NaCl kod klijanaca dobivenih iz sjemena starijih proizvodnih godina 2009./2010. i 2010./2011. te se one međusobno nisu značajno razlikovale (mHIP: 2009./2010. NaCl 0,267 g/biljci i kontrola 0,243 g/biljci; mKOR 2009./2010. NaCl 0,053 g/biljci i kontrola 0,50 g/biljci). Kod klijanaca dobivenih iz najmlađeg sjemena iz proizvodne godine 2011./2012. utvrđene su i najniže mase navedena dva pokazatelja. Također je značajno najniža masa kotiledona pri oba uvjeta naklijavanja utvrđena kod klijanaca dobivenih iz najmlađeg sjemena (NaCl 0,043 g/biljci i kontrola 0,039 g/biljci), dok su značajnu najvišu masu kotiledona imali klijanci iz sjemena najstarije proizvodne godine (NaCl 0,054 g/biljci i kontrola 0,055 g/biljci).

Prema F testu, u prosjeku za obje varijante osmoprimiranja sjemena krastavaca donorima H<sub>2</sub>S, uvjeti u kojima je naklijavano sjeme značajno su utjecali na energiju klijanja i standardnu klijavost samo kod sjemena iz proizvodne godine 2010./2011. (EK:  $P=0,0003$ ; SK:  $P=0,0474$ ) te je LSD testom utvrđena značajno veća vrijednost kod oba parametra u kontroli (EK 100%; SK 98%) (Tablica 13). U prosjeku za obje varijante naklijavanja sjemena, osmoprimiranje te interakcija osmoprimiranje x stres, nisu značajno utjecali na energiju klijanja i standardnu klijavost bez obzira na godinu proizvodnje sjemena.

**Tablica 13.** Značajnost utjecaja osmoprimiranja sjemena donorima H<sub>2</sub>S (300  $\mu$ M GYY4137, 300  $\mu$ M NaHS), solnog stresa u klijanju (kontrola i NaCl) i njihovih interakcija po godinama proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.) na energiju klijanja (EK) i standardnu klijavost (SK) (%).

FAKTOR	VARIJANTA	EK			SK		
		2009./10.	2010./11.	2011./12.	2009./10.	2010./11.	2011./12.
Osmoprimiranje sjemena	NaHS	95	98	98	93	98	97
	GYY4137	94	98	99	92	97	99
	F test	0,73	1,03	0,68	0,45	0,18	3,98
	P	0,4088	0,3310	0,4253	0,5137	0,6779	0,0694
Solni stres u klijanju	Kontrola	95	100 A	98	93	98 A	98
	NaCl	94	97 B	99	92	96 B	98
	F test	0,30	24,37	0,60	0,42	4,88	0,79
	P	0,5936	0,0003	0,4529	0,5313	0,0474	0,4016
Osmoprimiranje x Stres	F test	0,29	0,86	0,60	0,41	3,13	1,90
	P	0,5977	0,3713	0,4529	0,5318	0,1022	0,1929

\*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (A,B,C;  $P=0,05$ ).

Prema F testu, u prosjeku za obje varijante naklijavanja sjemena krastavaca, osmoprimiranje je značajno utjecalo na masu hipokotila kod sjemena iz proizvodnih godina 2009./2010. ( $P=0,0292$ ) i 2011./2012. ( $P=0,0369$ ) te je LSD testom kod klijanaca dobivenih iz starijeg sjemena utvrđena značajno veća masa u tretmanu s GYY4137 (0,263 g/biljci), dok je kod sjemena iz 2011./2012. godine, tretman s NaHS značajno povećao masu hipokotila (0,217 g/biljci) (Tablica 14).

**Tablica 14.** Značajnost utjecaja osmoprimiranja sjemena donorima H<sub>2</sub>S (300  $\mu$ M GYY4137, 300  $\mu$ M NaHS), solnog stresa u klijanju (kontrola i NaCl) i njihovih interakcija po godinama proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.) na masu (g) hipokotila (mHIP), kotiledona (mKOT) i korijena (mKOR) (g/biljci).

FAKTOR	VARIJANTA	mHIP			mKOT			mKOR		
		09./10.	10./11.	11./12.	09./10.	10./11.	11./12.	09./10.	10./11.	11./12.
Osmopri- miranje sjemena	NaHS	0,245 B	0,243	0,217 A	0,055	0,051	0,043	0,050	0,050	0,044
	GYY4137	0,263 A	0,242	0,202 B	0,054	0,050	0,040	0,051	0,052	0,038
	F test	6,13	0,01	5,51	0,44	0,22	4,60	0,18	0,72	3,84
	P	0,0292	0,9189	0,0369	0,5196	0,6451	0,0532	0,6803	0,4115	0,0738
Solni stres u klijanju	Kontrola	0,242 B	0,231 B	0,196 B	0,055	0,051	0,039 B	0,049	0,049	0,041
	NaCl	0,267 A	0,254 A	0,223 A	0,054	0,051	0,043 A	0,052	0,053	0,043
	F test	11,03	5,30	18,71	2,98	0,02	10,53	1,09	3,66	0,49
	P	0,0061	0,0400	<0,0001	0,1100	0,8812	0,0070	0,3176	0,0799	0,4960
Osmopr. x Stres	F test	0,78	0,00	3,39	2,86	0,38	1,70	0,26	4,55	0,12
	P	0,3938	0,9789	0,0906	0,1164	0,5493	0,2166	0,6170	0,0543	0,7374

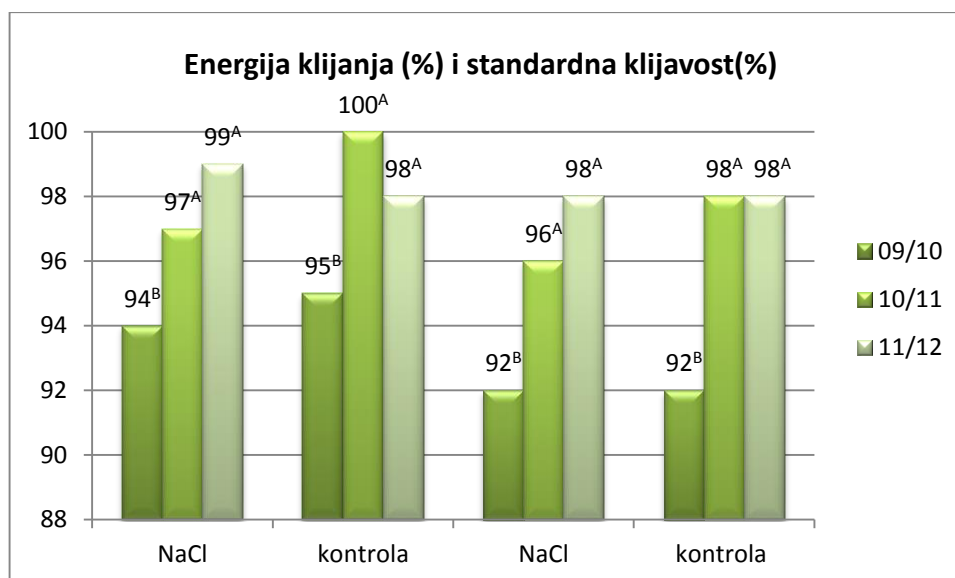
\*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (A,B,C;  $P=0,05$ ).

U prosjeku za obje varijante osmoprimiranja sjemena, varijante naklijavanja također su značajno utjecale na masu hipokotila kod klijanaca dobivenih iz sve tri proizvodne godine sjemena (2009./2010.:  $P=0,0061$ ; 2010./2011.:  $P=0,0400$ ; 2011./2012.  $P<0,0001$ ) te na masu kotiledona kod klijanaca iz sjemena proizvedenog 2011./2012. ( $P=0,0070$ ).

LSD testom je utvrđena značajno viša masa hipokotila i kotiledona kod sjemena naklijavanog u prisustvu NaCl-a (mHIP: 2009./2010. 0,267 g/biljci, 2010./2011. 0,254 g/biljci 2011./2012. 0,223 g/biljci; mKOT: 2009./2010. 0,043 g/biljci).

## 5. RASPRAVA

Standardna klijavost i energija klijanja vrlo su bitni pokazatelji kvalitete i vigora sjemena, a čiji su rezultati neizostavni u planiranju norme sjetve (Lisjak i sur., 2009.). Najniže vrijednosti energije klijanja (94-95%) i standardne klijavosti (92%) su, očekivano, utvrđene kod najstarijeg sjemena iz proizvodne godine 2009./2010. pri obje varijante stresa u klijanju (*Grafikon 1*).



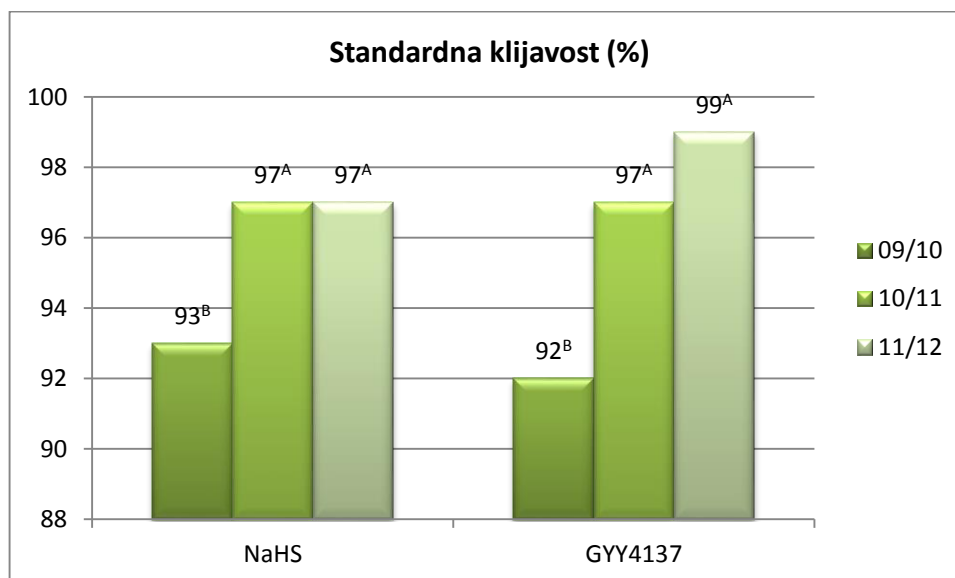
**Grafikon 1.** Standardna klijavost i energija klijanja sjemena krastavca u postotcima (%). Razlike između proizvodnih godina sjemena (2009./2010.; 2010./2011.; 2011./2012.) prikazane po varijantama stresa pri klijanju (kontrola i 25 mM NaCl).

Na navedene pokazatelje vigora sjemena utječe velik broj parametara poput genetskih karakteristika i metoda selekcije sjemena, starosti sjemena zatim klimatskih uvjeta tijekom samog uzgoja sjemenskog usjeva, načina dorade sjemena i uvjeta skladištenja (Ibrahim i sur. 2012.; Pimpini i sur., 2002.). Beraković (2009.) navodi kako je fiziološka dozrelost sjemena također važan biološki čimbenik klijavosti jer nedozrelo sjeme ima nepotpuno razvijenu klicu pa mu je i klijavost znatno manja u odnosu na potpuno dozrelo sjeme. Stoga je nakon sjetve usjeva bitno uskladištiti sjeme u optimalnim uvjetima za pojedinu biljnu vrstu s ciljem usporavanja fizioloških procesa u sjemenkama koji dovode do razgradnje akumuliranih rezervi te narušavanja integriteta stanice, a što se nadalje manifestira padom vigora. Međutim, bez obzira na uvjete, starenjem se u sjemenu intenziviraju procesi razgradnje staničnih membrana i proteina, inaktivacije bitnih hidrolitičkih enzima, razgradnje membrana organela kao i oštećenja genetskog materijala (Walters, 1998.; McDonald, 1999.; Narayana i sur., 2003.). Dakle, sklop svih navedenih činitelja starenja sjemena utjecao je podjednako i na pad klijavosti



krastavca u našim istraživanjima, bez obzira je li ono naklijavano u prisustvu vode ili pak u uvjetima solnog stresa.

Također, u prosjeku za obje varijante stresa u klijanju, najstarije sjeme krastavca iz proizvodne godine 2009./2010. je imalo značajno najnižu standardnu klijavost kod obje varijante osmoprimiranja sjemena donorima sumporovodika te je pri tretmanu s NaHS ona iznosila 93%, a pri tretmanu s GYY4137 92% (*Grafikon 2*). Standardna klijavost kod mlađeg sjemena iz proizvodnih godina 2010./2011. i 2011./2012. se kretala između 97 i 99% te se nije međusobno značajno razlikovala. Usporedba postotka standardne klijavosti po godinama starosti sjemena ukazuje na podjednak utjecaj varijante osmoprimiranja na navedeni parametar, bez obzira je li H<sub>2</sub>S oslobođen iz sporootpuštajućeg donora GYY4137 ili pak brzootpuštajućeg kao što je NaHS.

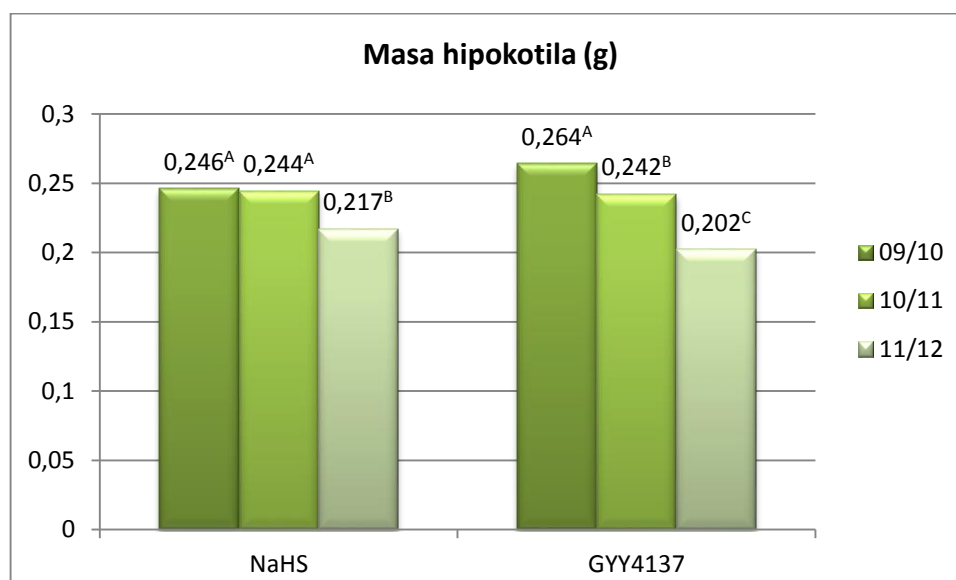


**Grafikon 2.** Standardna klijavost sjemena krastavca u postotcima (%). Razlike između proizvodnih godina sjemena (2009./2010.; 2010./2011.; 2011./2012.) prikazane po varijantama osmoprimiranja (NaHS i GYY4137).

Zhang i suradnici (2010.) su u svojim istraživanjima utjecaja tretmana sjemena pšenice s NaHS utvrdili da osim povećanja klijavosti u uvjetima osmotskog stresa izazvanog predtretmanom sjemena s PEG-6000, NaHS povećava i produkciju endogenog H<sub>2</sub>S. Također je ispitivan i utjecaj ostalih spojeva koji sadrže sumpor poput S<sub>2</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>, kao i sam Na<sup>+</sup> te utvrđeno da nijedan navedeni spoj ne poboljšava klijavost toliko značajno kao H<sub>2</sub>S generiran upravo iz NaHS. Rezultati njihovih istraživanja također upućuju da H<sub>2</sub>S djeluje na povećanje aktivnosti amilaze i esteraze - ključnih enzima u fiziološkim procesima koji prethode klijanju. Možda za aktivaciju hidrolize rezervnih spojeva pohranjenih u endospermu te njihovo

prevođenje u jednostavnije fiziološki aktivne kemijske spojeve tijekom početne faze klijanja, nije toliko bitna brzina otpuštanja  $H_2S$ , naročito ako djeluje u vrlo malim količinama, koliko njegova sama prisutnost. Pri sjemenju osmoprimiranom s NaHS, godina starosti sjemena nije značajno utjecala na energiju klijanja, dok je pri tretmanu s GYY4137 najmlađe sjeme imalo značajnu veću energiju klijanja (99%) u odnosu na najstarije sjeme, kod kojeg je ona iznosila 94%. Ni u jednoj od varijanti osmoprimiranja interakcija godina proizvodnje sjemena i solnog stresa nije značajno utjecala na navedene parametre, što upućuje na podjednak utjecaj  $H_2S$  bez obzira na godinu starosti sjemena i varijantu solnog stresa.

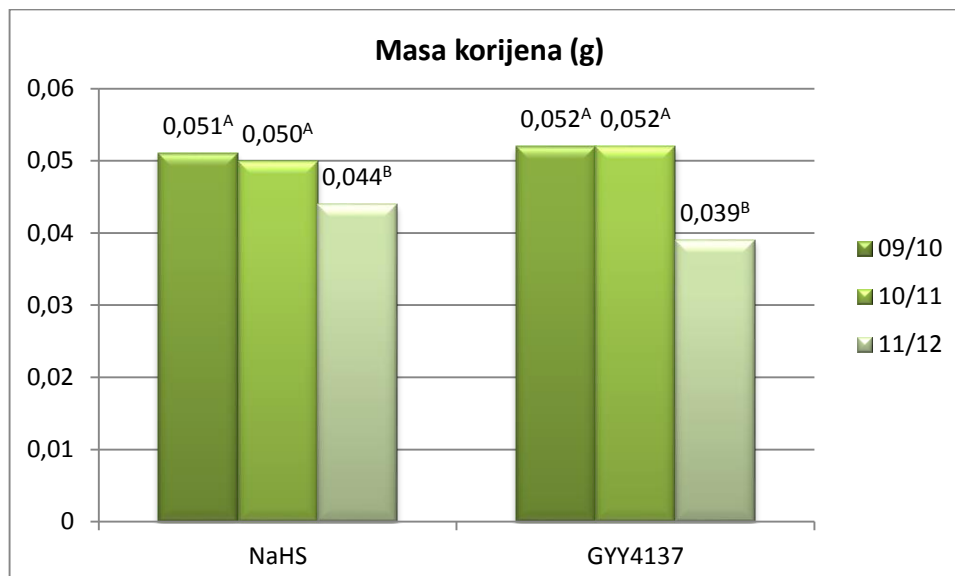
Interesantno je da su klijanci naklijavani iz mlađeg sjemena iz proizvodnih godina 2010./2011. i 2011./2012. imali značajno manju masu hipokotila i korijena u usporedbi s klijancima naklijavanih iz najstarijeg sjemena (*Grafikoni 3 i 4*).



**Grafikon 3.** Masa hipokotila klijanaca krastavca u gramima (g). Razlike između proizvodnih godina sjemena (2009./2010.; 2010./2011.; 2011./2012.) prikazane po varijantama osmoprimiranja (NaHS i GYY4137).

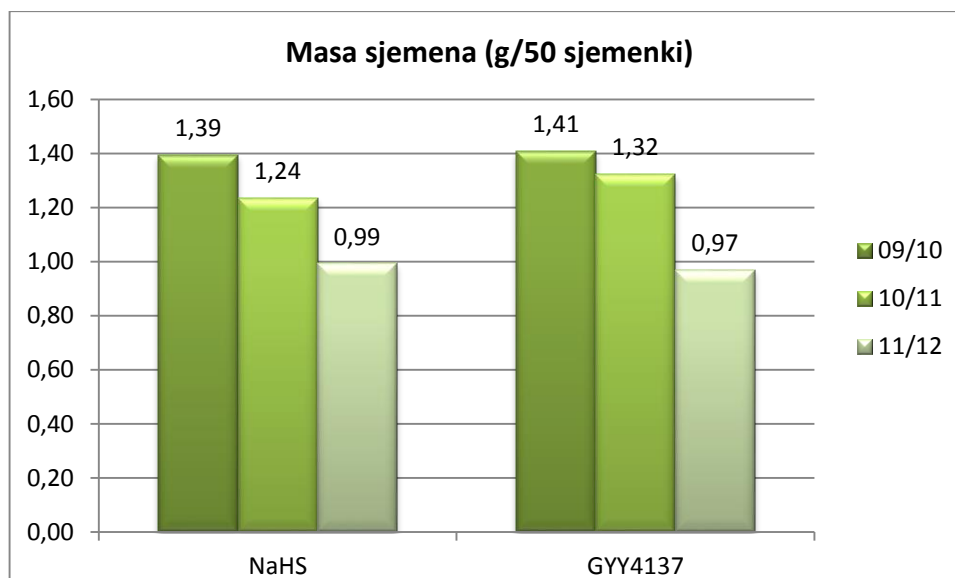
U prosjeku za obje varijante solnoga stresa pri klijanju, odnos masa hipokotila (*Grafikon 3*) i masa korijena (*Grafikon 4*) po godinama deklaracije sjemena je bio sličan, bilo da se radi o osmoprimiranju s sporootpuštajućim (GYY4137) ili pak brzootpuštajućim (NaHS) donorom sumporovodika. I kod mase hipokotila i kod mase korijena ta razlika je bila izraženija kod sjemena osmoprimiranog s GYY4137, gdje je kod klijanaca iz najstarijeg sjemena utvrđena 23% veća masa hipokotila te prosječno 25% veća masa korijena u usporedbi s klijancima dobivenim iz najmlađeg sjemena. Pri tretmanu s NaHS, mase hipokotila i korijena kod klijanaca

uzgojenih iz najmlađeg sjemena su bile u prosjeku 12% niže od onih utvrđenih kod klijanaca iz preostale dvije godine deklaracije sjemena (2010./2011. i 2011./2012).



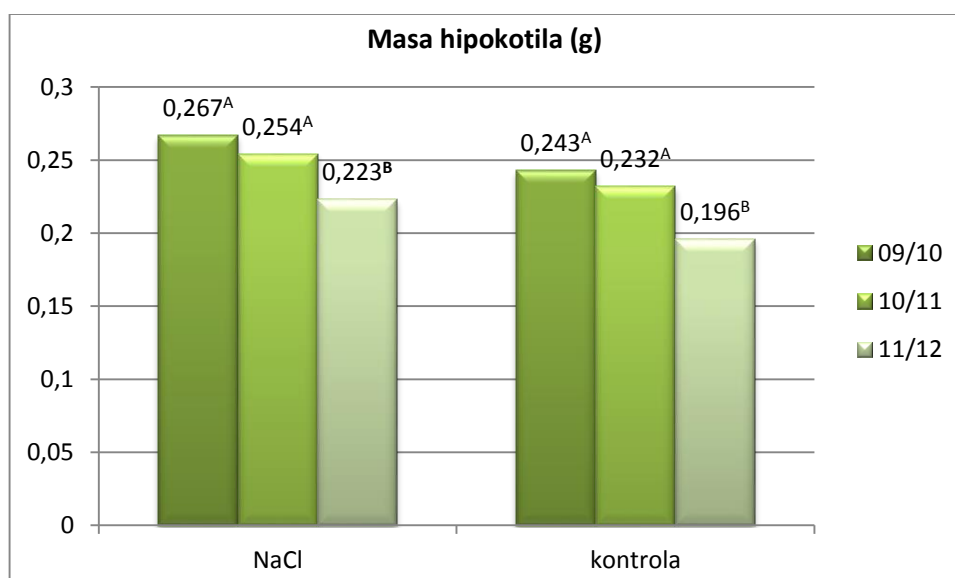
**Grafikon 4.** Masa korijena klijanaca krastavca u gramima (g). Razlike između proizvodnih godina sjemena (2009./2010.; 2010./2011.; 2011./2012.) prikazane po varijantama osmoprimiranja (NaHS i GYY4137).

Postoje brojne studije koje su ispitivale utjecaj veličine sjemena na klijavost i mase klijanaca kod različitih vrsta poljoprivrednih usjeva (Kawade i sur., 1987; Roy i sur., 1996; Guberac i sur., 1998.), čiji rezultati ukazuju na veliku varijaciju između vrsta. Had i suradnici (2012.) rezultatima svojih istraživanja na klijancima suncokreta, uzgojenih iz sjemena biljaka uzgajanih pri više varijanti navodnjavanja, potvrđuju vrlo značajne dvosmjerne korelacije između veličine odnosno mase sjemena i mase hipokotila te korijena klijanaca. Slične rezultate su dobili Kajdan i Yagmur (2008.) u istraživanjima provedenim na pšenoraži, čije su sjemenke prema veličini svrstali u tri grupe te utvrdili da u uvjetima osmotskog i solnog stresa veće sjeme daje i klijance veće mase. Bez obzira što je u našim istraživanjima starije sjeme krastavca imalo značajnu nižu energiju klijanja i standardnu klijavost, prosječna masa hipokotila i korijena kod razvijenih klijanaca je bila značajno veća, najvjerojatnije zbog toga što je i početna masa sjemena bila veća nego ona iz proizvodnih godina 2010./2011. i 2011./2012 (*Grafikon 5*).

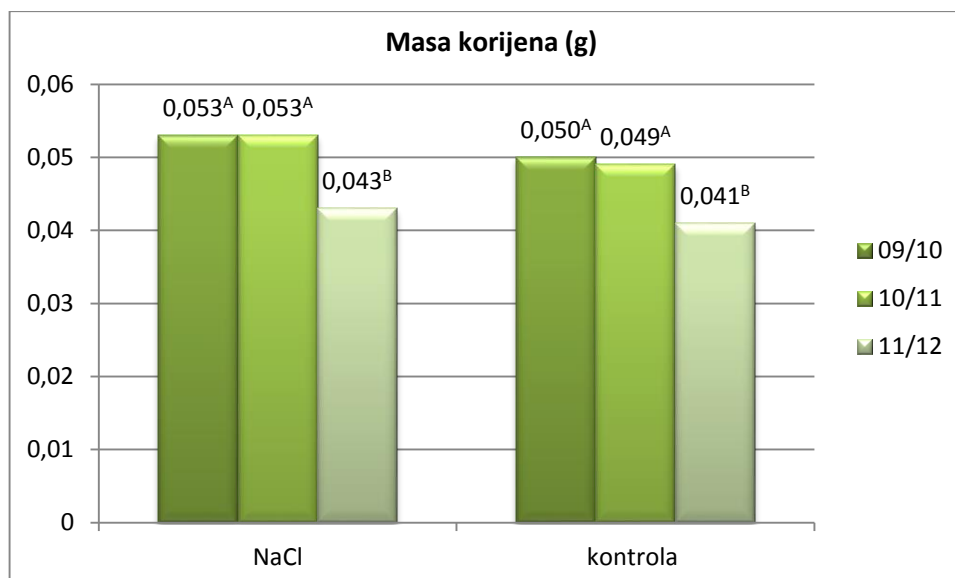


**Grafikon 5.** Prosječne mase 50 sjemenki krastavca u gramima (g/50 sjemenki) nakon osmoprimiranja i sušenja. Razlike između proizvodnih godina sjemena (2009./2010.; 2010./2011.; 2011./2012.) prikazane po varijantama osmoprimiranja (NaHS i GYY4137).

Kod kontrole kao i kod varijante u kojoj je sjeme naklijavano pri 25 mM NaCl, najveće mase hipokotila i korijena su utvrđene kod klijanaca dobivenih iz najstarijeg sjemena te su mase hipokotila za obje varijante naklijavanja bile veće u prosjeku za 17% dok su mase korijena bile veće oko 18% (Grafikoni 6 i 7).

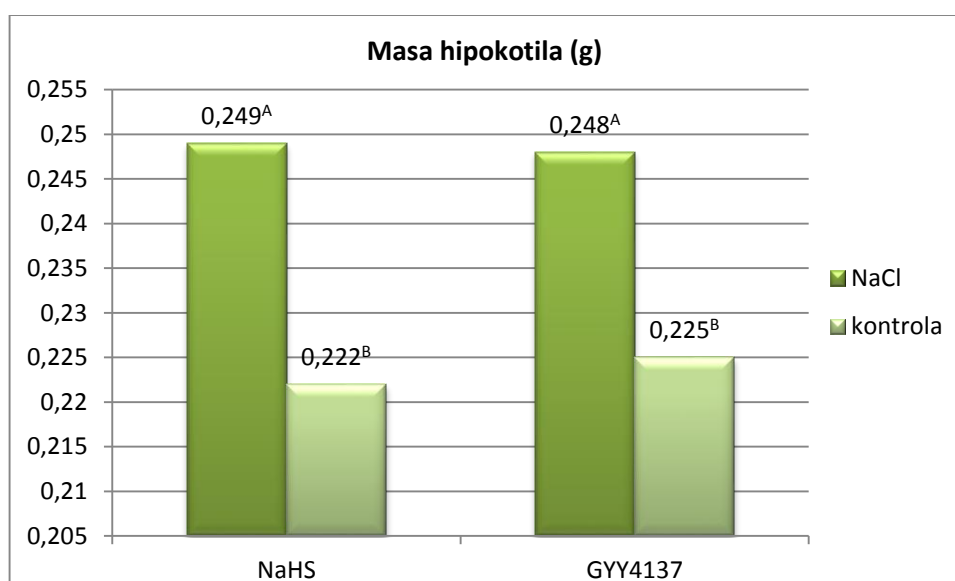


**Grafikon 6.** Masa hipokotila klijanaca krastavca u gramima (g). Razlike između proizvodnih godina sjemena (2009./2010.; 2010./2011.; 2011./2012.) prikazane po varijantama stresa pri klijanju (kontrola i 25 mM NaCl).



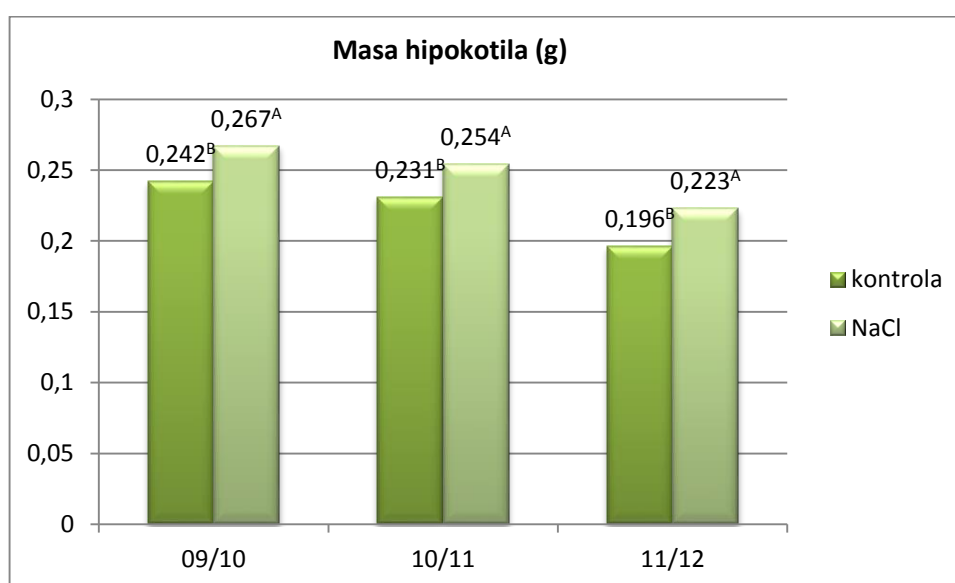
**Grafikon 7.** Masa korijena klijanaca krastavca u gramima (g). Razlike između proizvodnih godina sjemena (2009./2010.; 2010./2011.; 2011./2012.) prikazane po varijantama stresa pri klijanju (kontrola i 25 mM NaCl).

Dakle, bez obzira na prisustvo soli pri klijanju, utjecaj godine na masu korijena i hipokotila je bio jednak što opet upućuje na mogući utjecaj prosječne mase sjemena na mjerene pokazatelje porasta klijanaca i potvrđuje da se iz sjemena veće početne mase razvijaju veći klijanci (*Grafikon 5*). Značajno veće mase kotiledona utvrđene kod klijanaca uzgojenih iz starijeg sjemena potvrđuju da su oni tijekom heterotrofnog stadija razvoja imali na raspolaganju i veću zalihu rezervne tvari, a što je rezultiralo bržim porastom svježje mase korijena i hipokotila klijanaca (*Tablice 10 i 12*).



**Grafikon 8.** Masa hipokotila klijanaca krastavca u gramima (g). Razlike između varijanti stresa pri klijanju (kontrola i NaCl) prikazane po varijantama osmoprimiranja sjemena (NaHS i GYY4137).

Varijanta naklijavanja osmoprimiranog sjemena, također je značajno utjecala na masu hipokotila klijanaca u prosjeku za sve ispitivane godine deklaracije sjemena te je pri obje varijante osmoprimiranja donorima H<sub>2</sub>S utvrđen jednak stimulativni učinak 25 mM otopine NaCl na masu hipokotila (*Grafikon 8*). Pri obje varijante osmoprimiranja sjemena, masa hipokotila utvrđena kod klijanaca na solnom stresu je bila u prosjeku 10% veća od mase utvrđene u kontroli. Varijanta naklijavanja nije značajno utjecala na mase korijena i kotiledona klijanaca. Također, ako usporedimo mase hipokotila klijanaca po godinama starosti sjemena, vidljiv je stimulativni djelovanje 25 mM otopine NaCl na mase hipokotila koje su bile u prosjeku 11% veće nego one utvrđene kod kontrole (*Grafikon 9*).



**Grafikon 9.** Masa hipokotila klijanaca krastavca u gramima (g). Razlike između varijante stresa pri klijanju (kontrola i NaCl) prikazane po godinama deklaracije sjemena (2009./2010.; 2010./2011.; 2011./2012.).

Biljke u uvjetima solnog stresa najčešće imaju smanjen udjelo suhe tvari (Rahimi i sur., 2011.), međutim, postoje i studije koje potvrđuju stimulativno djelovanje soli na akumulaciju iste, što ovisi o samoj fiziološkoj prilagodbi biljaka na uvjete solnog stresa ali i o razini te trajanju stresa (Unlukara i sur., 2008.). Sivritepe i sur. (2003.) su tijekom 3 dana na 20°C osmoprimirali sjeme dinje (*Cucumis melo* L.) otopinom NaCl konduktiviteta 18 mS/cm. Nakon sjetve navodnjavali su biljke dinje otopinama rastućih konduktiviteta (4,5, 9, 13,5 i 18 mS/cm), što je približno ekvivalentno koncentracijama između 40 mM i 170 mM NaCl, dodajući NaCl u fertirigacijsku otopinu. Utvrdili su da prethodno osmoprimirano sjeme lakše podnosi naknadni solni stres tijekom uzgoja te da najniža razina solnog stresa može djelovati stimulativno na rast biljaka. Nadalje, Patade i sur. (2011.) su ispitujući klijavost sjemena paprike (*Capsicum annuum* L.) pri

tretmanima s otopinama NaCl rastućih koncentracija (0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 do 300 mM), zaključili da niža koncentracija otopine NaCl (25 mM) pozitivno utječe na klijavost sjemena paprike, stimulirajući ubrzani rast korijena i razvoj klice te takav predtretman doprinosi boljoj aklimatizaciji i sposobnosti klijanja i rasta biljaka u uvjetima naknadnog solnog stresa.

U našim istraživanjima sjeme krastavca je naklijavano u prisustvu otopine NaCl konduktiviteta 2,81 mS/cm, što je približno ekvivalent 25 mM NaCl. Sukladno rezultatima prethodno navedenih istraživanja, možemo zaključiti da ovakva otopina ne izaziva razinu solnog stresa koji bi se kroz narušavanje ionske homeostaze i osmotskog potencijala stanice inhibitorno odrazio na porast klijanaca, te je također utvrđen blagi stimulativni utjecaj otopine niske koncentracije NaCl na pokazatelje ranog porasta mladih klijanaca krastavca.

Wang i sur. (2011.) su utvrdili da niske koncentracije NaHS (100  $\mu$ M) nemaju značajan utjecaj na povećanje klijavosti kod biljaka lucerne (*Medicago sativa* L.) u usporedbi s netretiranim biljkama. Međutim, kada su biljke naklijavane u prisustvu NaHS pri solnom stresu uz 100 mM otopinu NaCl, spomenuti donor H<sub>2</sub>S je smanjio inhibitorni učinak NaCl na klijanje. Osim toga, Zhang i sur. (2008.a, 2009.b, 2010.a, 2010.) su u svojim opsežnim istraživanjima različitih vrsta stresa kod više vrsti agrikulturnih biljaka također dokazali stimulativnu ulogu H<sub>2</sub>S na rast korijena i nadzemnog dijela klijanaca. Uzevši u obzir da smo u našim istraživanjima osmoprimirali sjeme s donorima H<sub>2</sub>S te ga naklijavali u otopini NaCl niske koncentracije (koja evidentno stimulativno djeluje na rast klijanaca), moguć je kumulativni efekat ova dva tretmana koji je pozitivno utjecao na akumulaciju mase hipokotila i korijena kod klijanaca krastavca.

## 6. ZAKLJUČAK

1. U prosjeku za obje varijante naklijavanja, najniže vrijednosti energije klijanja i standardne klijavosti su utvrđene kod klijanaca uzgojenih iz najstarijeg sjemena iz 2009./2010. godine, što upućuje na gubitak vigora sjemena uzrokovanog starenjem.
2. Najstarije sjeme krastavca iz proizvodne godine 2009./2010. je imalo najnižu standardnu klijavost kod obje varijante osmopriranja sjemena donorima sumporovodika što ukazuje na podjednaki efekat  $H_2S$ , bez obzira je li on generiran iz sporootpuštajućeg donora poput GYY4137 ili brzootpuštajućeg donora kao što je NaHS.
3. Klijanci naklijavani iz mlađeg sjemena (iz proizvodnih godina 2010./2011. i 2011./2012.) su imali značajno manju masu hipokotila i korijena u usporedbi s klijancima naklijavanih iz najstarijeg sjemena, pri obje varijante osmopriranja donorima  $H_2S$ .
4. U prosjeku za obje varijante osmopriranja donorima  $H_2S$  i kod kontrole i pri solnom stresu, najveće mase hipokotila i korijena su utvrđene kod klijanaca dobivenih iz najstarijeg sjemena.
5. Značajno veće mase kotiledona utvrđene kod klijanaca iz starijeg sjemena potvrđuju da su oni tijekom heterotrofnog stadija razvoja imali na raspolaganju i veću zalihu rezervne tvari, a što je rezultiralo bržim porastom svježe mase korijena i hipokotila, što zajedno sa dvije prethodno navedene konstatacije potvrđuje da se iz sjemena veće početne mase razvijaju i veći klijanci.
6. Pri obje varijante osmopriranja sjemena donorima  $H_2S$  ali i za sve godine deklariranja sjemena, utvrđena je pojačana akumulacija svježe tvari što upućuje na stimulativni učinak niske razine solnog stresa na masu hipokotila.
7. Povećana akumulacija svježe mase hipokotila i korijena kod klijanaca krastavca nakon osmopriranja sjemena s donorima  $H_2S$  te naklijavanja u otopini NaCl niske koncentracije, upućuje na mogućnost kumulativnog efekta ova dva tretmana.



## 7. POPIS LITERATURE

1. Ajouri, A., Asgedom, H., Becker, M. (2004.): Seed priming enhances germination and seedling growth of barley under conditions of P and Zn Deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 167(5), 630–636.
2. Aneja, V., Schlesinger, W.H., Erisman, J.W. (2008.): Farming pollution. *Nature Geoscience* 1, 409-411.
3. Basra, S.M.A., Afzal, I., Rashid, R.A., Hameed, A. (2005.b): Inducing salt tolerance in wheat by seed vigor enhancement techniques. *International Journal of Biology and Biotechnology* 2, 173–179.
4. Beraković, I. (2009.): Utjecaj hibrida, frakcija sjemena i tipa skladišta na kvalitetu sjemena kukuruza. Magistarski rad. Poljoprivredni fakultet Osijek, str. 80.
5. Desikan, R. (2010.): Sniffing stomata. *New Phytologist* 188, 910-913.
6. Epstein, E., Rains, D.W., Valentine, R.C., Hollaender A. (1980.): Responses of plants to saline environments. In: *Genetic engineering of osmoregulation*. Plenum Press New York, 7-21.
7. García-Mata, C., Lamattina, L. (2010.): Hydrogen sulphide, a novel gasotransmitter involved in guard cell signaling. *New Phytologist* 188, 977-984.
8. Ghassemi-Golezani, K., Esmaeilpour, B. (2008.): The effect of salt priming on the performance of differentially matured cucumber (*Cucumis sativus*) seeds. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 36(2), 67-70.
9. Guberac, V., Martincic, J., Maric, S. (1998.): Influence of seed size on germinability germ length, rootlet length and grain yield in spring oat. *Bodenkultur* 49, 13-18.
10. Hadi, H., Khazaei, F., Babaei, N., Daneshian, J., Hamidi, A. (2012.): Evaluation of water deficit on seed size and seedling growth of sunflower cultivars. *International Journal of AgriScience* 2(3), 280 – 290.
11. Hällgren, J-E., Fredriksson, S-A. (1982.): Emission of hydrogen sulfide from sulfur dioxide-fumigated pine trees. *Plant Physiology* 70, 456-459.
12. Hamman, B., Egli, D.B., Koning, G. (2002.): Seed vigour, soliborne pathogens, preemergent growth, and soybean seedling emergence. *Crop Science* 42, 451-457.
13. Harris, D. (1996.): The effects of manure, genotype, seed priming, depth and date of sowing on the emergence and early growth of *Sorghum bicolor* (L.) Moench in semiarid Botswana. *Soil and Tillage Research* 40, 73-88.

14. Kawade, R.M., Ugale, S.D., Patil, R.B. (1987.): Effect of seed size on germination, seedling vigor and test weight of pearl millet. *Seed Res* 15, 210–213.
15. Kaya, M.D., Okcu, G., Atak, M., Cikili, Y., Kolsaric, O. (2006.): Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *European Journal of Agronomy* 24, 291-295.
16. Kaydan, D., Yagmur, M. (2008.): Germination, seedling growth and relative water content of shoot in different seed sizes of triticale under osmotic stress of water and NaCl. *African Journal of Biotechnology* 7(16), 2862-2868.
17. Khajeh-Hosseini, M., Powell, A., Bingham, I.J. (2003.): The interaction between salinity stress and seed vigour during germination of soybean seeds. *Seed Science and Technology* 31, 715-725.
18. Kourtidis, K., Kelesis, A., Petrakakis, M. (2008.): Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) in urban ambient air. *Atmospheric Environment* 42, 7476-7482.
19. Lešić, R., Borošić, J., Butorac, I., Herak-Ćustić, M., Poljak, M., Romić, D. (2002.): Povrčarstvo. Zrinski d.d. Čakovec.
20. Lisjak, M. (2012.): Interakcije H<sub>2</sub>S i NO u prijenosu signala u listovima uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.) i paprike (*Capsicum annuum* L.). Sveučilište J.J. Strossmayera, Poljoprivredni fakultet Osijek, Doktorski rad str. 120.
21. Lisjak, M., Srivastava, N., Teklić, T., Civale, L., Lewandowski, K., Wilson, I., Wood, M.E., Whiteman, M., Hancock, J.T. (2010.): A novel hydrogen sulfide donor causes stomatal opening and reduces nitric oxide accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(12), 931-935.
22. Lisjak, M., Špoljarević, M., Agić, D., Andrić, L. (2009.): Praktikum iz fiziologije bilja- ispitivanje kakvoće sjemena. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, 46-50.
23. Lütke-Entrup, N., Oehmichen, J. (2000.): Lehrbuch des pflanzenbaues, Bd. 2: Kulturpflanzen. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen-Buer, 593-606.
24. Matotan, Z., Međimurec, T. (1998.): Proizvodnja krastavaca za preradu. Hrvatski zadružni savez, Zagreb.
25. Marcos-Filho J., McDonald M.B. (1998). Sensitivity of RAPD analysis, germination and vigour tests to detect the intensity of deterioration of naturally and artificially aged soybean seeds. *Seed Science and Technology* 26, 141-157.
26. McDonald, M.B. (1999.): Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology* 27, 177–237.

27. McDonald, M.B. (2000.): Seed priming. In: Seed Technology and Biological Basis. Sheffield Academic Press, England 9, 287-325.
28. Morse, J.W. Millero., F.J, Cornwell, J.C., Rickard, D. (1987.): The chemistry of the hydrogen sulfide and iron sulfide systems in natural waters. *Earth-Science Reviews* 24, 1-42.
29. Munns, R. (2002.): Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25, 239–250.
30. Nasri, N., Kaddour, R., Mahmoudi, M., Baatour, O., Bouraoui, N., Lachaâl, M. (2011.): The effect of osmopriming on germination, seedling growth and phosphatase activities of lettuce under saline condition. *African Journal of Biotechnology* 10(65), 14366-14372.
31. Neamatollahi, E., Bannayan, M., Souhani, D.A., Ghanbari, A. (2009.): Hydropriming and osmopriming effects on cumin (*Cuminum Cyminum* L.) seeds germination. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 3, 09-27.
32. Pahoja, V.M., Siddiqui, S.H., Narejo, M.N., Umrani, J.H. (2013.): Response of hydropriming and osmopriming on germination and seedling growth of sunflower (*Helianthus Annuus* L.) under salt stress. *International Journal of Agricultural Science and Research* 3(2), 71–80.
33. Parađiković, N. (2009.): Opće i specijalno povrćarstvo i cvjećarstvo. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
34. Patade, V.Y., Kumari, M., Zakwan, A. (2011.): Seed priming mediated germination improvement and tolerance to subsequent exposure to cold and salt stress in capsicum. *Research Journal of Seed Science* 4(3), 125-136.
35. Pimpini, F., Filippini, M.F., Sambo, P., Gianquinto, G. (2002.): The effect of seed quality (seed colour variation) on storability, germination temperature and field performance of radicchio. *Seed Science & Tehnology* 30, 392-402.
36. Rahimi, A., Biglarifard, A., Mirdehghan, H., Borghei, S.F. (2011.): Influence of NaCl salinity on growth analysis of strawberry cv. camarosa. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* 7(4), 145-156.
37. Rennenberg, H. (1983.): Role of O-acetylserine in hydrogen sulphide emission from pumpkin leaves in response to sulphate. *Plant Physiology* 73, 560-565.
38. Roy, S.K.S., Hamid, A., Giashuddin Miah, M., Hashem, A. (1996.): Seed size variation and its effects on germination and seedling vigour in rice. *Journal of Agronomy and Crop Science* 176, 79-82.

39. Schaffer, A.F., Vanderlip, R.L. (1999.): The effect of conditioning on soybean seed quality. *Journal of Production Agriculture* 12, 455-459.
40. Siddique, A.B., Wright, D. (2004.): Effects of date of sowing on seed yield, seed germination and vigour of peas and flax. *Seed Science and Technology* 32(2), 455-472.
41. Sivritepe, N., Sivritepe, H.O., Eris, A. (2003.): The effects of NaCl priming on salt tolerance in melon seedling grown under saline condition. *Scientia Horticulturae* 97, 229-237.
42. Song, K., Xyu, S., Luo, G., Yao, Z. (2013.): Effects of soil soluble salt content on seed germination and seedling growth of cucumber. *Acta Agriculturae Zhejiangensis* 3, 593-597.
43. TeKrony, D.M., Egli, D.B., White, G.M. (1987.): Seed production and technology. In: *Soybeans: Improvement, Production and Uses*. J.R. 2nd Edition, Agronomy N-16, ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wisconsin USA, 295-353.
44. Tiwari, R.S., Picchioni, G.A., Steiner, R.L., Hughs, S.E., Jones, D.C., Zhang, J. (2013.): Genetic variation in salt tolerance during seed germination in a backcross inbred line population and advanced breeding lines derived from upland cotton × pima cotton 53(5), 1974-1982.
45. Türkan, I., Demiral, T. (2009.): Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 67(1), 2-9.
46. Murthy, U.M.N., Kumar, P.P., Sun, W.Q. (2003.): Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.). Wilczek: Lipid Peroxidation, Sugar Hydrolysis, Maillard Reactions and Their Relationship to Glass State Transition. *Journal of Experimental Botany* 54(384), 1057-1067.
47. Ünlükara, A., Cemek, B., Karaman, S., Erşahin, S. (2008.): Response of lettuce (*Lactuca sativa* var. *crispa*) to salinity of irrigation water. *Journal of Crop and Horticultural Science* 36, 256-273.
48. Vieira, R.D., TeKrony, D.M., Egli, D.B., Rucker, M. (2001.): Electrical conductivity of soybean seeds after storage in several environments. *Seed Science and Technology* 29, 599-608.
49. Vukadinović, V., Lončarić, Z. (1997.): Ishrana bilja. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek. 84-85.
50. Walters, C. (1998.): Understanding the mechanisms and kinetics of seed ageing. *Seed Science Research* 8, 223-244.
51. Wang, Y., Le, L., Weiti, C., Sheng, X., Wenbiao, S., Ren, W. (2011.): Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. *Plant Soil* 351, 107-119.

52. Wilson, L.G., Bressan, R.A., Filner, P. (1978.): Light-dependent emission of hydrogen sulphide from plants. *Plant Physiology* 61, 184-189.
53. Zhang, H., Ye, Y.K., Wang, S.H., Luo, J.P., Tang, J., Ma, D.F. (2009.a): Hydrogen sulphide counteracts chlorophyll loss in sweet potato seedling leaves and alleviates oxidative damage against osmotic stress. *Plant Growth Regulation* 58, 243-250.
54. Zhang, H., Hu, L.Y., Hu, K.D., He, Y.D., Wang, S.H., Luo, J.P. (2008.a): Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates the oxidative damage against copper stress. *Journal of Integrative Plant Biology* 50, 1518-1529.
55. Zhang, H., Wang, M., Hu, L., Wang, S., Hu, K., Bao, L., Luo, J. (2010.): Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination under osmotic stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 57(4), 532-539.
56. Zhang, H., Tan, ZQ., Hu, L.Y., Wang, S.H., Luo, J.P., Jones, R.L. (2010.a): Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in germinating wheat seedlings. *Journal of Integrative Plant Biology* 52(6), 556-567.
57. Zhang, H., Tang, J., Liu, XP., Wang, Y., Yu, W., Peng, W.Y., Fang, F., Ma, D.F., Wei, Z.J., Hu, L.Y. (2009.b): Hydrogen sulfide promotes root organogenesis in *Ipomoea batatas*, *Salix matsudana* and *Glycine max*. *Journal of Integrative Plant Biology* 51(12), 1086-1094.
58. Zhang, L., De Schryver, P., De Gussemé, B., De Muynck, W., Boon, N., Verstraete, W. (2008.b): Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission control in sewer systems: A review. *Water Research* 42, 1-12.
59. Zuo, W. (2010.): Hydrogen sulfide stimulates wheat seeds germination and counteracts oxidative damages against salinity and aluminium stress. Hefei University of Technology, Hefei, Doktorski rad.

#### **Internet stranice:**

<http://de.wikipedia.org/wiki/Gurke> / Pristupljeno: 05.06.2014.

<http://faostat3.fao.org> / Pristupljeno: 05.06.2014.

<http://www.doktor.rs/txt/> Pristupljeno: 08.06.2014.

<http://www.poljoprivredni-forum.com/> Pristupljeno: 08.06.2014.

[http://www.poljoberza.net/PG16\\_3.aspx](http://www.poljoberza.net/PG16_3.aspx) / Pristupljeno: 15.06.2014.

<http://www.spaceship-earth.org/REM/Naeveke.htm> / Pristupljeno: 17.06.2014.

## 8. SAŽETAK

Osmoprimiranje je tehnika kojom se djelomično ili u potpunosti sjeme hidrira s vodom, različitim osmotskim otopinama ili solima, što potiče metaboličku aktivnost, povećava vigor i pospješuje klijanje. U ovom istraživanju, sjeme krastavca (*Cucumis sativus* L.) iz tri proizvodne godine (2009./10., 2010./11. i 2011./12.) je nakon osmoprimiranja donorima sumporovodika ( $H_2S$ ) različitih kemijskih svojstava, sintetskim sporootpuštajućim donatorom GYY4137 te brzo otpuštajućim donatorom NaHS, naklijavano pri 25 mM NaCl odnosno vodi. Osnovna hipoteza je da  $H_2S$  utječe na klijavost i pokazatelje vigora klijanaca kod sjemena krastavca naklijavanog u prisustvu soli te da postoje značajne razlike između primijenjenih donora  $H_2S$ ; NaHS i GYY4137. U prosjeku, klijanci uzgojeni iz mlađeg sjemena (2010./11. i 2011./12.) su imali značajno veću energiju klijanja te manje mase hipokotila i korijena u odnosu na klijance dobivene iz starijeg sjemena, najvjerojatnije zbog veće početne mase sjemena. Najstarije sjeme krastavca iz proizvodne godine 2009./2010. je imalo najnižu standardnu klijavost kod obje varijante osmoprimiranja sjemena donorima  $H_2S$  što ukazuje na podjednaki efekt  $H_2S$ , bez obzira iz kojeg je donora generiran. U varijanti naklijavanja u prisustvu soli je također utvrđena pojačana akumulacija svježih tvari, što upućuje na stimulativni učinak niske razine solnog stresa na masu hipokotila. Pošto povećanje mase hipokotila i korijena nakon primjenjenih tretmana upućuje na interakciju  $H_2S$  i blagog solnog stresa, daljnja istraživanja je potrebno usmjeriti u razjašnjenje njihove pojedinačne uloge u fazi klijanja sjemena krastavca.

## 9. SUMMARY

Osmopriming is a technique where the seed is partially or fully hydrated with water, different osmotic solutions or salts, which stimulates metabolic activity, increases vigor and promotes germination. In this study, cucumber seeds (*Cucumis sativus* L.) from three production years (2009/10, 2010/11 and 2011/12) has been germinated in the presence of 25 mM of NaCl or water, after osmopriming with hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donors having different chemical properties - synthetic slow releasing donor GYY4137 and fast releasing donor NaHS. The main hypothesis is that H<sub>2</sub>S influences on germination and seedlings vigor indicators of cucumber seed germinated in the presence of salt, and that there are significant differences in the effects of the applied H<sub>2</sub>S donors. In average, seedlings grown from younger seed (harvested in 2010/11 and 2011/12) had significantly higher germination energy and lower hypocotyls and roots weight as compared to seedlings obtained from older seed, most likely due a greater initial seed weight. The oldest cucumber seed, harvested in the season 2009/10, had the lowest standard germination rate for both variants of seed osmopriming with H<sub>2</sub>S donors, which points to the same effect of H<sub>2</sub>S regardless from which donor it has been generated. In a variant of germination in the presence of salt, the enhanced increment of fresh weight was also established, suggesting that low levels of salt stress may have stimulatory effect on the hypocotyl weight. Since an increase in hypocotyl and root weight after applied treatments suggests the interaction of H<sub>2</sub>S and mild salt stress, further research should be focused on clarifying their respective roles in germination stage of cucumber seed.

## 10. POPIS TABLICA

**Tablica 1.** Sistematika krastavaca (*Cucumis sativus* L.). (Stranica 2.)

**Tablica 2.** Kemijski sastav hranjivih tvari u 100 g krastavaca (Lešić i sur., 2002.). (Stranica 4.)

**Tablica 3.** Udio minerala i vitamina u 100 g krastavaca (Lešić i sur., 2002.). (Stranica 5.)

**Tablica 4.** Površine i prinosi krastavaca u RH u razdoblju 2003.-2012. god. (Stranica 6.)

**Tablica 5.** Površine i ukupni prinosi najvećih proizvođača krastavaca u svijetu (2012. god.). (Stranica 6.)

**Tablica 6.** Klasiranje krastavca s obzirom na dužinu i promjer ploda. (Stranica 10.)

**Tablica 7.** Iznošenje i preporučena količina hraniva za očekivani prinos od 200 t/ha u zaštićenom uzgoju (Parađiković, 2009. - izvor Haifa chemicals). (Stranica 11.)

**Tablica 8.** Značajnost utjecaja godine proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.), i osmopriranja sjemena donorima H<sub>2</sub>S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS), solnog stresa u klijanju (kontrola i NaCl) i njihovih interakcija na energiju klijanja (EK), standardnu klijavost (SK) (%), masu hipokotila (mHIP), kotiledona (mKOT) i korijena (mKOR) (g/biljci). (Stranica 23.)

**Tablica 9.** Značajnost utjecaja godine proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.), solnog stresa u klijanju (kontrola i NaCl) i njihovih interakcija pri različitim varijantama osmopriranja sjemena donorima H<sub>2</sub>S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS) na energiju klijanja (EK) i standardnu klijavost (SK) (%). (Stranica 25.)

**Tablica 10.** Značajnost utjecaja godine proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.), solnog stresa u klijanju (kontrola i NaCl) i njihovih interakcija pri različitim varijantama osmopriranja sjemena donorima H<sub>2</sub>S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS) na masu hipokotila (mHIP), masu kotiledona (mKOT) i masu korijena (mKOR) (g/biljci). (Stranica 26.)

**Tablica 11.** Značajnost utjecaja godine proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.), osmopriranja sjemena donorima H<sub>2</sub>S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS) i njihovih interakcija pri solnom stresu u klijanju (kontrola i NaCl) na energiju klijanja (EK) i standardnu klijavost (SK) (%). (Stranica 27.)

**Tablica 12.** Značajnost utjecaja godine proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.), osmopriranja sjemena donorima H<sub>2</sub>S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS) i njihovih interakcija pri solnom stresu u klijanju (kontrola i NaCl) na masu hipokotila (mHIP), kotiledona (mKOT) i korijena (mKOR) (g/biljci). (Stranica 27.)

**Tablica 13.** Značajnost utjecaja osmopriranja sjemena donorima H<sub>2</sub>S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS), solnog stresa u klijanju (kontrola i NaCl) i njihovih interakcija po godinama proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.) na energiju klijanja (EK) i standardnu klijavost (SK) (%). (Stranica 28.)

**Tablica 14.** Značajnost utjecaja osmopriranja sjemena donorima H<sub>2</sub>S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS), solnog stresa u klijanju (kontrola i NaCl) i njihovih interakcija po godinama proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.) na masu (g) hipokotila (mHIP), kotiledona (mKOT) i korijena (mKOR) (g/biljci). (Stranica 29.)



## **11. POPIS SLIKA**

**Slika 1.** Krastavac - *Cucumis sativus* L. (Stranica 3.)

**Slika 2.** Vanjski uzgoj krastavaca na armaturi. (Stranica 8.)

**Slika 3.** Uzgoj krastavaca u plasteniku na crnoj malč foliji. (Stranica 9.)

**Slika 4.** Kruženje sumpora u prirodi pomoću sumpornih bakterija. (Stranica 12.)

**Slika 5:** Postavljanje pokusa. (Stranica 21.)

## 12. POPIS GRAFIKONA

**Grafikon 1.** Standardna klijavost i energija klijanja sjemena krastavca u postotcima (%). Razlike između proizvodnih godina sjemena (2009./2010.; 2010./2011.; 2011./2012.) prikazane po varijantama stresa pri klijanju (kontrola i 25 mM NaCl). (Stranica 30.)

**Grafikon 2.** Standardna klijavost sjemena krastavca u postotcima (%). Razlike između proizvodnih godina sjemena (2009./2010.; 2010./2011.; 2011./2012.) prikazane po varijantama osmoprimiranja (NaHS i GYY4137). (Stranica 31.)

**Grafikon 3.** Masa hipokotila klijanaca krastavca u gramima (g). Razlike između proizvodnih godina sjemena (2009./2010.; 2010./2011.; 2011./2012.) prikazane po varijantama osmoprimiranja (NaHS i GYY4137). (Stranica 32.)

**Grafikon 4.** Masa korijena klijanaca krastavca u gramima (g). Razlike između proizvodnih godina sjemena (2009./2010.; 2010./2011.; 2011./2012.) prikazane po varijantama osmoprimiranja (NaHS i GYY4137). (Stranica 33.)

**Grafikon 5.** Prosječne mase 50 sjemenki krastavca u gramima (g/50 sjemenki) nakon osmoprimiranja i sušenja. Razlike između proizvodnih godina sjemena (2009./2010.; 2010./2011.; 2011./2012.) prikazane po varijantama osmoprimiranja (NaHS i GYY4137). (Stranica 34.)

**Grafikon 6.** Masa hipokotila klijanaca krastavca u gramima (g). Razlike između proizvodnih godina sjemena (2009./2010.; 2010./2011.; 2011./2012.) prikazane po varijantama stresa pri klijanju (kontrola i 25 mM NaCl). (Stranica 34.)

**Grafikon 7.** Masa korijena klijanaca krastavca u gramima (g). Razlike između proizvodnih godina sjemena (2009./2010.; 2010./2011.; 2011./2012.) prikazane po varijantama stresa pri klijanju (kontrola i 25 mM NaCl). (Stranica 35.)

**Grafikon 8.** Masa hipokotila klijanaca krastavca u gramima (g). Razlike između varijanti stresa pri klijanju (kontrola i NaCl) prikazane po varijantama osmoprimiranja sjemena (NaHS i GYY4137). (Stranica 35.)

**Grafikon 9.** Masa hipokotila klijanaca krastavca u gramima (g). Razlike između varijante stresa pri klijanju (kontrola i NaCl) prikazane po godinama deklaracije sjemena (2009./2010.; 2010./2011.; 2011./2012.). (Stranica 36.)

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera  
Poljoprivredni fakultet u Osijeku  
Sveučilišni diplomski studij, smjer Povrćarstvo i cvjećarstvo

Diplomski rad

### UTJECAJ SUMPOROVODIKA ( $H_2S$ ) NA VIGOR SJEMENA KRSTAVCA (*Cucumis sativus* L.) U UVJETIMA SOLNOG STRESA

Srđan Glodić

#### Sažetak:

Osmoprimiranje je tehnika kojom se djelomično ili u potpunosti sjeme hidrira s vodom, različitim osmotskim otopinama ili solima, što potiče metaboličku aktivnost, povećava vigor i pospješuje klijanje. U ovom istraživanju, sjeme krastavca (*Cucumis sativus* L.) iz tri proizvodne godine (2009./10., 2010./11. i 2011./12.) je nakon osmoprimiranja donorima sumporovodika ( $H_2S$ ) različitih kemijskih svojstava, sintetskim sporootpuštajućim donatorom GYY4137 te brzootpuštajućim donatorom NaHS, naklijavano pri 25 mM NaCl odnosno vodi. Osnovna hipoteza je da  $H_2S$  utječe na klijavost i pokazatelje vigora klijanaca kod sjemena krastavca naklijavanog u prisustvu soli te da postoje značajne razlike između primijenjenih donora  $H_2S$ , NaHS i GYY4137. U prosjeku, klijanci uzgojeni iz mlađeg sjemena (2010./11. i 2011./12.) su imali značajno veću energiju klijanja te manje mase hipokotila i korijena u odnosu na klijance dobivene iz starijeg sjemena, najvjerojatnije zbog veće početne mase sjemena. Najstarije sjeme krastavca iz proizvodne godine 2009./2010. je imalo najnižu standardnu klijavost kod obje varijante osmoprimiranja sjemena donorima  $H_2S$  što ukazuje na podjednaki efekt  $H_2S$ , bez obzira iz kojeg je donora generiran. U varijanti naklijavanja u prisustvu soli je također utvrđena pojačana akumulacija svježe tvari, što upućuje na stimulativni učinak niske razine solnog stresa na masu hipokotila. Pošto povećanje masa hipokotila i korijena nakon primijenjenih tretmana upućuje na interakciju  $H_2S$  i blagog solnog stresa, daljnja istraživanja je potrebno usmjeriti u razjašnjenje njihove pojedinačne uloge u fazi klijanja sjemena krastavca.

**Rad je izrađen pri:** Poljoprivredni fakultet u Osijeku

**Mentor:** doc.dr.sc. Miroslav Lisjak

**Broj stranica:** 50

**Broj slika i grafikona:** 14

**Broj tablica:** 14

**Broj literaturnih navoda:** 65

**Broj priloga:** 0

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:**  $H_2S$ , NaHS, GYY4137, osmoprimiranje, krastavac, sjeme

**Datum obrane:**

**Stručno povjerenstvo za obranu**

**1. prof.dr.sc. Tihana Teklić, predsjednik**

**2. doc.dr.sc. Miroslav Lisjak, mentor**

**3. prof.dr.sc. Nada Paradiković, član**

**Rad je pohranjen u:** Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilište u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**Faculty of Agriculture University**  
**University Graduate Studies, course Vegetable and flower growing**

**Graduate thesis**

### INFLUENCE OF HYDROGEN SULFIDE (H<sub>2</sub>S) ON CUCUMBER (*Cucumis sativus* L.) SEED VIGOR IN SALT STRESS CONDITIONS

Srđan Glodić

#### Summary:

Osmopriming is a technique where the seed is partially or fully hydrated with water, different osmotic solutions or salts, which stimulates metabolic activity, increases vigor and promotes germination. In this study, cucumber seeds (*Cucumis sativus* L.) from three production years (2009/10, 2010/11 and 2011/12) has been germinated in the presence of 25 mM of NaCl or water, after osmopriming with hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donors having different chemical properties - synthetic slow releasing donor GYY4137 and fast releasing donor NaHS. The main hypothesis is that H<sub>2</sub>S influences on germination and seedlings vigor indicators of cucumber seed germinated in the presence of salt, and that there are significant differences in the effects of the applied H<sub>2</sub>S donors. In average, seedlings grown from younger seed (harvested in 2010/11 and 2011/12) had significantly higher germination energy and lower hypocotyls and roots weight as compared to seedlings obtained from older seed, most likely due a greater initial seed weight. The oldest cucumber seed, harvested in the season 2009/10, had the lowest standard germination rate for both variants of seed osmopriming with H<sub>2</sub>S donors, which points to the same effect of H<sub>2</sub>S regardless from which donor it has been generated. In a variant of germination in the presence of salt, the enhanced increment of fresh weight was also established, suggesting that low levels of salt stress may have stimulatory effect on the hypocotyl weight. Since an increase in hypocotyl and root weight after applied treatments suggests the interaction of H<sub>2</sub>S and mild salt stress, further research should be focused on clarifying their respective roles in germination stage of cucumber seed.

**Thesis performed at:** Faculty of Agriculture in Osijek

**Mentor:** PhD Miroslav Lisjak, assistant professor

**Number of pages:** 50

**Number of figures:** 14

**Number of tables:** 14

**Number of references:** 65

**Number of appendices:** 0

**Original in:** Croatian

**Key words:** H<sub>2</sub>S, NaHS, GYY4137, osmopriming, cucumber, seed,

**Thesis defended on date:**

**Reviewers:**

1. PhD *Tihana Teklić*, full professor
2. PhD *Miroslav Lisjak*, assistant professor
3. PhD *Nada Parađiković*, full professor

**Thesis deposited at:** Library, Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Kralja Petra Svačića 1d.